

Recherches sur les myoglobines

(hémoglobines musculaires)

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Juillet 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Hélène VIEIL

Née le 17 septembre 1918, à Marseille,

Examineurs de la Thèse	{	MM. ROCHE, <i>Professeur, Président,</i> NICLOUX, <i>Professeur Faculté Méde-</i> <i>cine Strasbourg.</i> MALMÉJAC, <i>Professeur,</i> DUBOULOZ, <i>Agrégé.</i>	}	Assesseurs
---------------------------	---	---	---	------------

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

—
1942



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548805_0069

Recherches sur les myoglobines

(hémoglobines musculaires)

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Juillet 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Hélène VIEIL

Née le 17 septembre 1918, à Marseille,

Examineurs de la Thèse	{	MM. ROCHE, <i>Professeur</i> , Président, NICLOUX, <i>Professeur Faculté Méde- cine Strasbourg.</i> MALMÉJAC, <i>Professeur</i> , DUBOULOZ, <i>Agrégé.</i>	}	Assesseurs
---------------------------	---	---	---	------------

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1942



PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, AUBARET, COTTE

Chargés de cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses.....	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	N...
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale.....	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie	MALMÉJAC
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO
Professeur sans chaire.....	POURTINET

Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI

CARCASSONNE

BERTHIER

DUBOULOZ

SAUTET

BALANSARD

MM. BRAHIC

FIGARELLA

PAILLAS

ARNOUX

DELPHAUT

MM. IMBERT

AUDIER

CHOSSON

DOR

RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique

SALMON

Chimie minérale.....

ARNOUX

Clinique des maladies contagieuses.....

PERIOT

Médecine opératoire

DOR

Microbiologie.....

BOYER

Neuro-Chirurgie.....

ARNAUD

Obstétrique.....

CHOSSON

Pharmacodynamie aux Pharmaciens

DELPHAUT

Psychiatrie.....

ALLIEZ

Toxicologie.....

GUILLOT

Clinique gynécologique.....

FIGARELLA

Clinique chirurgicale infantile.....

R. IMBERT

Clinique stomatologique.....

ACHARD

JE DÉDIE AFFECTUEUSEMENT CE TRAVAIL

A LA CHÈRE MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

*en témoignage de ma reconnaissance
et de ma profonde tendresse.*

A MES FRÈRES

A MON FIANCÉ

avec toute mon affection

A MON MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE

*qu'il trouve ici l'expression de mon
respectueux dévouement et de ma
profonde gratitude.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR YVES DERRIEN

*qui a bien voulu m'aider dans l'accom-
plissement de ce travail, ma très
vive reconnaissance.*

A MON JURY DE THÈSE

qui me fait l'honneur de juger ce travail.

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE
ET A MES AMIS.

INTRODUCTION.

I. — Hémoglobines sanguines et hémoglobines musculaires ; hémoglobines et myoglobines.

Chez les Vertébrés supérieurs le transport de l'oxygène dans le sang et sa mise en réserve dans les tissus sont assurés par des pigments respiratoires d'un type particulier : les hémoglobines. Celles-ci sont toutes constituées par l'union d'un même groupement prosthétique, le protohème, avec une protéine. Elles possèdent toutes des propriétés physiques et chimiques identiques (spectre à deux bandes des dérivés oxygénés, aptitude à former des combinaisons réversibles avec l'oxygène et l'oxyde de carbone) ; mais ces propriétés présentent suivant la localisation sanguine ou musculaire du pigment et suivant l'espèce animale dont il provient des particularités dont l'étude a permis d'une part, de distinguer les hémoglobines sanguines des hémoglobines musculaires ou myoglobines et, d'autre part, de montrer la spécificité du pigment de chaque espèce animale dans l'une et dans l'autre série.

Les hémoglobines sanguines sont mieux connues que les pigments musculaires. Existant en abondance dans le sang au taux moyen de 12 à 14 p. 100 dans le sang des mammifères, certaines sont facilement cristallisables ; aussi, leur étude est-elle très avancée. Leur structure, répondant au schéma général indi-

qué plus haut, est définitivement établie en ce qui concerne le groupement prosthétique grâce aux travaux de NENCKI et ZALESKI, de KÜSTER, de WILLSTÄTTER et surtout d'Hans FISCHER, ayant conduit à identifier le protohème au dérivé ferreux du 1-2-5-8 tétraméthyl, 2-4 divinylporphine, 6-7 propanoïque. Quant à leur constituant protéique, la globine, particulièrement étudiée par le Professeur ROCHE et ses élèves [25], sa constitution présente la même complexité que celle de toutes les protéines solubles. Certains de ses caractères et son rôle dans la spécificité des pigments hémoglobiniques ont néanmoins pu être précisés.

Les caractères spécifiques présentés par les pigments sanguins des divers animaux tiennent à des différences de composition, et sans doute aussi de structure, de leurs globines. Celles-ci sont toutes de caractère faiblement basique ou neutre (point isoélectrique voisin de $\text{pH} = 7$). Elles renferment de l'histidine en quantité plus grande que toutes les autres protéines isolées des organismes animaux ou végétaux, soit de 7,5 à 9 p. 100. Par ailleurs, elles se combinent à l'hème pour régénérer des hémoglobines alors qu'aucune autre protéine n'est apte à participer à cette réaction (BERTIN-SANS et MOITESSIER [7], ROCHE [26]).

Néanmoins, des différences apparaissent entre les chromoprotéides lorsque l'on étudie des préparations provenant d'animaux d'espèces diverses. Leur affinité pour l'oxygène (BARCROFT), pour l'oxyde de carbone (NICLOUX), n'est pas identique ; de même la position de leurs bandes d'absorption spectrales (VLÈS). Ces différences ont pu être reliées à l'inégalité de leur teneur en divers acides aminés (ROCHE, DUBOU-

LOZ et JEAN [30], ROCHE et MOURGUE [32¹]. Cette diversité dans la composition des globines se traduit par des différences importantes dans la solubilité des chromoprotéides, récemment étudiées par ROCHE, DERRIEN et MOUTTE [28]. Tous ces faits concourent à l'établissement de la notion de spécificité des hémoglobines sanguines dans la série des Vertébrés (1).

Comme nous l'avons signalé, certains organes, entre autres les muscles rouges, renferment un chromoprotéide du même type que celui circulant dans le sang. Chez de nombreux mammifères, le quart environ de l'hémoglobine totale de l'organisme est fixé sur les fibres musculaires. L'existence même de la spécificité des pigments sanguins chez les divers animaux permet de penser *a priori* qu'il peut, chez un même animal, exister une hémoglobine différente dans le sang et dans le muscle puisque celle du muscle, empruntant son oxygène à celle du sang, doit nécessairement avoir une plus grande affinité pour ce gaz. Aussi, l'étude du pigment localisé dans le muscle, désigné sous le nom de myoglobine depuis que l'on a précisé ses différences avec le pigment sanguin, auquel on réserve le nom d'hémoglobine, méritait-elle de retenir l'attention.

II. — Etat actuel de nos connaissances sur les myoglobines.

L'étude des pigments musculaires a présenté une très grande confusion jusqu'à une époque relativement récente (1925) où KEILIN a identifié les cytochro-

(1) Seules les chromoprotéides à groupement prosthétique hématinique des Cyclostomes, animaux constituant une classe particulière à la base de l'embranchement des vertébrés, contiennent une protéine différente des globines et analogue à certains égards à celle des érythrocrurines d'invertébrés (ROCHE et FONTAINE).

mes. Le muscle contient en effet deux sortes de pigments hématiniques : on trouve dans les muscles rouges une hémoglobine particulière désignée tout d'abord par MÖRNER (1897) sous le nom de myochrome, puis de myoglobine (GÜNTHER, 1921), et des chromoprotéides d'une autre structure, la myohématine de Mac MÜNN, dans laquelle KEILIN a pu distinguer trois constituants, les cytochromes *a*, *b* et *c*. Ces derniers pigments, dont on trouvera une étude générale dans la thèse de M. Th. BÉNÉVENT [5], sont essentiellement différents des hémoglobines, bien que contenant un groupement prosthétique hématinique. En effet, ils ne se combinent pas à l'oxygène ou à l'oxyde de carbone ; ils participent aux oxydo-réductions cellulaires en tant que transporteurs d'électrons (Fe_{II}

→ Fe_{III} — *e*). Seules les myoglobines, que l'on désigne souvent par le symbole MHb, appartiennent au même groupe de transporteurs d'oxygène que les pigments sanguins, elles s'en distinguent néanmoins par un certain nombre de caractères dont on trouvera la description dans la mise au point que leur a récemment consacré MILLIKAN [20-21] et dans divers mémoires de THEORELL [37 à 41] et de J. ROCHE [24].

A. — RÉPARTITION DES MYOGLOBINES.

On trouve en général ces pigments dans les muscles dont la contraction relativement lente développe une force importante. Les taux les plus élevés se rencontrent dans ceux dont le cycle complet d'activité dure environ une seconde et dont l'action peut être maintenue pendant longtemps. Les exemples les plus démonstratifs que l'ont peu donner à cet égard sont le cœur des mammifères, les pectoraux des oi-

seaux d'assez grande taille (Pigeon), les muscles des pattes chez les animaux coureurs (Cheval, Chien). Au contraire, les muscles qui se contractent régulièrement plus de deux ou trois fois par seconde sont pauvres en hémoglobine mais riches en cytochromes (cœur des petits mammifères tels la Souris, cœur des oiseaux, pectoraux d'insectes tels les Mouches, les Abeilles). Par ailleurs, les muscles dont l'activité répétée ne développe pas une grande force (cœur de Grenouille), ou ceux étant physiologiquement le siège de contractions violentes mais entrecoupées de repos (muscles des pattes chez la Grenouille) sont aussi riches en cytochrome et pauvres en hémoglobine. Comme l'a fait remarquer MILLIKAN, ce principe de répartition n'est pas universel car selon REY, LANCASTER, ROCHE et RAPHAËL, les muscles pharyngiens très actifs de certains gastéropodes (*Aphrodite*, *Limneus*, *Paludina*) renferment de l'hémoglobine tandis que le cœur de la plupart des invertébrés en est dépourvu. Chez le nouveau-né, le diaphragme est riche en myoglobine, celle-ci n'existant pratiquement pas dans le cœur, qui pourtant fonctionne plus tôt (JONXIS).

Dans l'ensemble, chez les mammifères, il existe une correspondance assez étroite entre la concentration en chromoprotéides dans le muscle et les besoins du tissu pour exercer une activité lente et soutenue. Ce principe se vérifie non seulement de muscle à muscle dans une espèce, mais encore d'espèce à espèce et d'une période à l'autre de la vie d'un sujet. Quand des muscles blancs et des muscles rouges coexistent dans un même segment de membre, comme le soleaire (rouge) et le gastrocnémien (blanc) chez le Chat, on observe que la contraction du pre-

mier est plus longue, sa tétanisation plus marquée et pouvant être maintenue pendant un temps plus long. C'est là un premier indice du rôle physiologique du pigment.

WHIPPLE et ROBSCHT-ROBBINS [43] ont poursuivi l'étude des variations de la teneur en pigment de divers muscles au cours de la vie et dans diverses conditions physiologiques. Voici quelques données empruntées à un travail de WHIPPLE :

Concentration en myoglobine dans divers muscles du Chien
(mg. p. 100 g. de tissus frais).

a) *Variation avec l'âge.*

Age	Patte arrière	Cœur	Teneur en Hb du sang (g. p. 100 g.)
2 mois.....	107	125	8,300
4 mois.....	205	222	9,400
Adulte.....	815	480	18,200
Vieux.....	680	480	15,700

b) *Variation avec l'exercice.*

Variété	Diaphragme	Cœur	Patte arrière
Chien de poche.	387	296	391
Taille moyenne..	723	450	700
Chien de chasse.		770	1,051

Comme on le voit par ces données, le rapport entre la teneur en pigment et l'activité physiologique est extrêmement net.

B. — PRÉPARATION DE LA MYOGLOBINE PURE.

Toutes les recherches antérieures à celles de THEORELL [37 à 41] (1932) ont été faites sur des extraits de muscle rouge non fractionnés ou imparfaitement fractionnés. La première méthode de préparation de la myoglobine, ayant permis l'isolement du pigment cristallisé, a été basée par THEORELL sur le principe suivant : Le muscle cardiaque du Cheval est soigneusement perfusé par l'artère coronaire (cinq litres au moins de sérum physiologique par organe) après une dissection grossière grâce à laquelle on élimine les tissus adipeux et tendineux le muscle cardiaque est broyé, puis additionné de la moitié de son poids d'eau et abandonné douze heures à 2-4 degrés. On centrifuge et l'on ajoute à l'extrait ainsi obtenu NaOH N jusqu'à $\text{pH} = 7,0$, puis le quart de son volume de solution saturée d'acétate de plomb basique. Il se forme alors un précipité blanchâtre contenant toutes les globulines du muscle, quand on opère à la température du laboratoire. On centrifuge et, si besoin est, on neutralise. On élimine l'excès de plomb à l'aide de phosphate disodique, en contrôlant sur des prises d'essais que la réaction ne se modifie pas sensiblement ; si elle s'acidifie on la ramène à la neutralité par addition de NaOH N. Après centrifugation, on réduit par une trace d'hydrosulfite et on sature le milieu d'oxyde de carbone pour empêcher une méthémoglobinisation. La solution obtenue, placée dans des sacs de collodion, est dialysée contre une solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée par NaOH N. Il se forme d'abord un précipité blanc d'albumine, adsorbant en petite quantité la myoglobine ; on l'élimine par centrifugation lorsqu'il

n'augmente plus sensiblement. On continue ensuite la dialyse en renouvelant la solution saturée de sulfate d'ammoniaque, et la myoglobine cristallise en vingt-quatre heures environ. Comme elle est la plupart du temps souillée d'albumine il convient de la fractionner en répétant les dernières des opérations que nous venons de décrire. Il a été possible d'obtenir par cette méthode, à partir du muscle de Cheval, un produit bien cristallisé dont la teneur en fer (valeur moyenne) est de 0,315 p. 100 (THEORELL, ROSSI). Selon ROSSI, le produit obtenu est pur après trois cristallisations, sa composition élémentaire devient alors constante ($\text{Fe} = 0,34$ p. 100, $\text{S} = 0,48$ p. 100). Nous avons répété au début de nos recherches ces manipulations et obtenu des produits possédant les propriétés décrites par THEORELL.

Cette méthode est à divers égards assez laborieuse, aussi MORGAN (1935) [22] a-t-il cherché à la simplifier. Comme le pigment musculaire est soluble dans des solutions 3 M d'un mélange tampon de phosphates mono et di-potassique de $\text{pH} = 6,3$, alors que l'hémoglobine sanguine du Cheval ne l'est pas, MORGAN procède de la manière suivante : le cœur de Cheval hâché finement, sans perfusion préalable, est traité suivant le mode opératoire réglé par THEORELL jusqu'à la précipitation par l'acétate de plomb basique. L'extrait est ensuite enrichi par un mélange de solutions de phosphate mono- et disodique à $\text{pH} = 6,6$, jusqu'à ce que la concentration soit égale à 3 M. On centrifuge alors le précipité de pigment sanguin formé. La myoglobine est ensuite cristallisée en présence de sulfate d'ammonium comme dans le procédé de THEORELL.

L'une et l'autre méthodes paraissent donner des

résultats identiques. Elles n'ont été appliquées jusqu'ici avec succès qu'à la myoglobine de Cheval. Aussi la description des propriétés du pigment musculaire que nous donneront par la suite se rapportent-elles à celui de cet animal. Des essais de préparation du même corps à partir de cœur de Porc, tentés par MORGAN n'ont donné aucun résultat mais ont donné satisfaction à Rossi.

C. — PROPRIÉTÉS CHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES.

Comme nous l'avons déjà rappelé le pigment musculaire présente les propriétés générales des hémoglobines, sa teneur en fer (0,345 p. 100) est identique à celle des pigments sanguins (THEORELL). Les résultats de l'analyse élémentaire faite par cet auteur sur deux préparations de myoglobine de cheval répondent à la composition centésimale suivante :

Préparations	C	H	N	S	Fe
I.	55,29	7,00	16,83	0,71	0,34
II.	54,70	7,10	16,47	0,50	0,34

La structure des chromoprotéides sanguins et musculaires apparait comme identique. Le groupement prosthétique de l'un et de l'autre est le protohème, mais le constituant protéique diffère. En effet, du protohème combiné à la globine musculaire d'un animal régénère sa myoglobine, tandis qu'il donne naissance au pigment sanguin quand on le combine à la globine sanguine du même animal (ROCHE, 1932 [26]). Toutefois, il n'existait antérieurement à notre

travail aucune étude sur les globines musculaires pouvant permettre de les différencier des globines sanguines. Au cours de la rédaction de notre thèse, une communication personnelle du Prof. G. QUAGLIARIELLO, de l'Université de Naples, nous a permis d'avoir connaissance des résultats obtenus récemment dans son laboratoire par le Professeur agrégé Rossi et que l'on peut ainsi résumer : La myoglobine de Cheval se distingue de l'hémoglobine du même animal par sa composition en acides aminés. Le rapport : Fe/arginine/histidine/lysine est égal à : 2/3/18/30 pour la première, à : 2/6/20/18 pour la seconde. Le rapport : Fe/S/ cystine est égal à : 25/60/12 pour la myoglobine, à : 25/62/20 pour l'hémoglobine. Comme on le verra plus bas, le travail de Rossi, simultané au nôtre, est en accord avec certaines de nos conclusions.

Une étude soigneuse de la combinaison de la myoglobine avec l'oxygène et l'oxyde de carbone a été poursuivie par THEORELL [39], puis par R. HILL [17] et par MILLIKAN [20-21]. Les pigments du muscle se combinent à ces deux gaz. Dans l'un et l'autre cas son spectre d'absorption présente deux bandes soit

pour MHbO ₂	$\alpha = 582$	$\beta = 542$
pour MHbCO	$\alpha = 579$	$\beta = 540$

Le spectre ultra-violet est très voisin de celui du pigment sanguin, il présente une très forte bande

pour MHbO ₂	$\gamma = 478$
pour MHbCO	$\gamma = 424$

Une bande γ' voisine de 340, et enfin une bande protéique dont le sommet est à 275 μ environ.

Qualitativement les dérivés oxygénés et oxycarbonés ont un spectre d'allure identique que l'on considère le pigment du muscle ou celui du sang de che-

val. Mais il existe une différence notable entre la position des bandes de l'une et de l'autre dans le spectre. En ce qui concerne la bande α , une règle établie par BARCROFT, ANSON, MIRSKY et OINUMA [2] a pu relier sa position à l'affinité relative des hémoglobines pour l'oxygène et pour l'oxyde de carbone. En effet, l'intervalle séparant l'axe de cette bande, mesuré en unités Angström Å dans les combinaisons avec l'oxygène et l'oxyde de carbone présente une valeur caractéristique pour l'hémoglobine sanguine de chaque espèce animale. Or, cet intervalle varie en fonction directe du logarithme du rapport des pressions d'oxygène et d'oxyde de carbone auxquelles une solution de pigment, saturée par une atmosphère contenant ces gaz, renferme 50 p. 100 de chromoprotéide oxygéné et 50 p. 100 de chromoprotéide oxycarboné. Cette règle a été vérifiée pour une série d'hémoglobines sanguines dont les bandes α sont séparées par un intervalle allant suivant les cas de 48 à 62 Å. Suivant ROCHE cet intervalle est égal à 31-34 Å pour diverses hémoglobines musculaires et, malgré cette importante différence, la relation de BARCROFT se vérifie également pour ces pigments. Ce fait, confirmé depuis par THEORELL, montre bien que, quelque soit leur localisation, une même relation générale existe entre le spectre et l'affinité pour les gaz de toutes les hémoglobines.

Un fait fondamental a été mis en évidence par THEORELL, à savoir : la myoglobine possède une affinité pour l'oxygène plus grande que l'hémoglobine sanguine, fait rapidement vérifié depuis par R. HILL [17]. Par ailleurs, l'un et l'autre auteurs ont établi les courbes de dissociation de l'oxymyoglobine en fonction de la pression de l'oxygène en faisant va-

rier divers facteurs. Il ressort d'un ensemble de travaux que la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine affecte l'allure d'une hyperbole équilatère, contrairement à celle du pigment sanguin laquelle est sigmoïde (BOHR, BARCROFT). Or, l'on a depuis longtemps rattaché les particularités de la courbe des pigments sanguins à leur poids moléculaire élevé (A. V. HILL) et, nous le verrons plus tard, le poids moléculaire du chromoprotéide du muscle est notablement moindre.

En ce qui concerne l'affinité pour l'oxygène de ces pigments que traduit leur courbe de dissociation, bornons-nous à constater que pour

pour $p\text{ O}_2 = 5\text{ mm. Hg.}$	MHbO ₂ = 60 p. 100
	HbO ₂ = 4 p. 100
$p\text{ O}_2 = 20\text{ mm. Hg.}$	MHbO ₂ = 78 p. 100
	HbO ₂ = 20 p. 100
$p\text{ O}_2 = 4\text{ mm. Hg.}$	MHbO ₂ = 92 p. 100
	HbO ₂ = 66 p. 100

Signalons en outre que l'action du pH sur l'affinité du pigment musculaire pour l'oxygène est minime, de même pour la température. Suivant MILLIKAN la vitesse de fixation de l'oxygène mesurée par la méthode de HARTHRIDGE et ROUGHTON est beaucoup plus rapide sur la myoglobine que sur l'hémoglobine de Cheval ; dans le premier cas la valeur obtenue est la plus forte déterminée jusqu'ici sur un corps biologique. De même, l'action de l'acide carbonique (effet BOHR) sur la dissociation de l'oxymyoglobine de Cheval est extrêmement faible. Ces faits rapprochent à certains égards la myoglobine des hémocyanines. Nous examinerons plus bas leur importance physiologique.

Le poids moléculaire du pigment musculaire a fait l'objet d'un travail de THEORELL [38] suivant lequel

la valeur de 34.000 devrait être adoptée. Plus récemment, SVEDBERG fait état dans diverses publications [36] de résultats obtenus par PEDERSEN, pour lequel la myoglobine aurait un poids moléculaire de 17.000. Toutes ces valeurs ont été obtenues par ultracentrifugation et, bien que celle publiée d'après PEDERSEN paraissent les plus probables, il nous a paru souhaitable de la contrôler par une autre méthode.

Quoiqu'il en soit, il est certain que la molécule du chromoprotéide musculaire est plus petite que celle de son homologue sanguin. Ce fait explique sans doute les particularités de certaines hémoglobinuries observées par CAMUS et PAGNIEZ [10], puis plus tard par KARLSTRÖM, par HEKTOEN, ROBSCHUIT-ROBBINS et WHIPPLE chez divers animaux, par CAMUS et PAGNIEZ, et KARLSTRÖM chez l'Homme et le Cheval. Si l'on injecte à des chiens des petites quantités d'hémoglobine sanguine, celle-ci n'est pas émise par l'urine tandis qu'au contraire l'injection d'extrait musculaire est suivi d'une myoglobinurie. La plupart des hémoglobinuries pathologiques ou accidentelles sont en réalité des myoglobinuries. Tel est le cas de « l'hémoglobinurie paroxystique a frigore » des chevaux survénant dans des conditions où le pigment musculaire passe dans le sang. Tel est aussi le cas, récemment décrit en Angleterre (BYWATERS et DELORY), chez des sujets présentant des brûlures importantes à la suite d'incendies provoqués par un raid aérien. Ces faits sont faciles à interpréter si, comme il le semble, la taille de la molécule de myoglobine est inférieure à celle des protéines sériques ; le rein pourrait alors opérer un véritable triage.

D. — RÔLE DE LA MYOGLOBINE DANS L'ORGANISME.

POUR MILLIKAN, la myoglobine peut assurer trois rôles : celui de transporteur d'oxygène, celui de catalyseur d'oxydation intracellulaire, et celui de réserve d'oxygène. La grande vitesse de diffusion de l'oxygène dans les fibres musculaires rend improbable le premier de ces rôles, sauf dans les périodes de besoin variable où la myoglobine servirait alors à régulariser l'apport de l'oxygène.

Quant au rôle catalytique du pigment, il ne peut être envisagé qu'à titre d'hypothèse, car on ne sait rien encore sur l'activité de la myoglobine en tant que catalase ou peroxydase. On peut toutefois remarquer avec MILLIKAN que certaines de ces propriétés sont intermédiaires à celle de l'oxyhémoglobine de Cheval et celle d'enzyme hématiniques.

Cette comparaison, établie par MILLIKAN, est basée sur l'analogie entre la fixation de l'oxygène par les chromoprotéides et celle du substrat par un enzyme (Théorie de MICHAELIS). Elle permet de penser que la myoglobine est plus voisine de l'oxydase que le pigment sanguin et serait « une sorte de station à mi-chemin entre le transporteur d'oxygène et le catalyseur d'oxydation. »

La théorie du rôle de réserve est seule étayée sur des faits précis. Pour être efficace, une réserve doit avoir une certaine capacité, se constituer et se réduire en fonction de $p\text{ O}_2$ et enfin pouvoir être mise en œuvre rapidement. Les données que nous avons rappelées plus haut sur la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine et de l'oxymyoglobine montrent que le pigment musculaire est susceptible par ses propriétés de jouer le rôle de réserve d'oxygène. De

*Propriétés comparées des pigments hémoglobiniques
de l'oxydase de levure et de la catalase du foie.*

Propriétés	Hb (cheval)	MHb (cheval)	Oxydase (levure)	Catalase (Foie)
Concentration en sub-strat permettant la demi saturation	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$
Constantes de vitesse de la combinai- son en substrat ($l/s. m. mol.$)	$7 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$< 2,3 \cdot 10^{-6}$	$< 7 \cdot 10^{-3}$
Constantes de vitesse de dissocia- tion ($l/seconde$)	40	40	5	$3 \cdot 10^{-5}$
Rapport O_2/CO à égalité de combi- naison	500	18	$1/10$	
Etat du fer	Fe^{II} oxydable	Fe^{II} facilement oxydable	$Fe^{II} \rightarrow Fe^{III}$	$Fe^{II} \rightarrow Fe^{III}$

même les vitesses des réactions, de formation et de dissociation de l'oxymyoglobine sont assez grandes pour que ce pigment assume une telle fonction physiologique. En effet, la réaction $\text{MHb} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{MHbO}_2$ exige 0,001 seconde et la réaction $\text{MHbO}_2 \longrightarrow \text{MHb} + \text{O}_2$, 0,01 seconde.

Il a été possible à MILLIKAN d'étudier la fonction physiologique du pigment musculaire dans le muscle soleaire du Chat *in situ*, innervé et irrigué normalement. Ces expériences, basées sur la mesure de l'absorption du pigment, au moyen d'un colorimètre à cellule photoélectrique, rendent compte directement de l'état d'oxygénation de la myoglobine dans le muscle et permettent de suivre avec grande précision ses modifications. Dans un muscle tétanisé la myoglobine perd de 9 à 40 p. 100 de son oxygène pendant la première seconde de sa contraction, même quand l'irrigation vasculaire demeure constante ; dès lors, le sang ne peut pas satisfaire immédiatement au besoin d'oxygène et la réserve en celui-ci se vide pour se reconstituer ensuite au repos.

Une réserve peut, soit régulariser un apport inconstant, soit permettre de satisfaire un besoin variable. C'est à ce second type de fonction que répond la présence de la myoglobine, tout au moins dans le soleaire du Chat. Dans les préparations de ce muscle la contraction ne réduit pas sensiblement la circulation du sang comme elle le fait chez l'Homme mais, malgré cela, la réserve tissulaire d'oxygène doit nécessairement entrer en jeu.

On jugera de l'importance de la fonction de la myoglobine dans le muscle cardiaque par les quelques données suivantes. Dans le cœur du Chien la concentration en myoglobine est environ de 0,5 p.

100, ce qui correspond à une capacité de fixation de l'oxygène égale à $0,008 \text{ cm}^3$ par gramme de tissu, or, la consommation en oxygène de celui-ci est de 4 cm^3 par gramme et par heure ; l'oxygène fixé au pigment est donc consommé en sept secondes, soit 560 fois par heure.

Dans une période de grande activité, le besoin peut être décuplé, la réserve ne dure alors qu'une demi-seconde. Si le débit de l'organe demeure le même tandis que la fréquence de la contraction augmente, le prélèvement d'oxygène sur la réserve doit diminuer d'autant plus. On peut même prévoir l'existence d'un rythme tel que l'oxygène dissous puisse satisfaire au besoin. Ce fait expliquerait l'absence de myoglobine dans le cœur des animaux à rythme cardiaque très rapide, dans les pectoraux des insectes, et sa présence dans le diaphragme et les muscles des pattes des mammifères, ces derniers ayant des contractions relativement lentes et énergiques. Une concentration exceptionnellement élevée en myoglobine a été observée dans le muscle des phoques dont, selon THEORELL le suc de presse renferme de 5 à 10 p. 100 de pigment, ce qui correspond à une réserve d'oxygène permettant une demi-minute d'activité modérée et va de paire avec les conditions habituelles de vie de ces animaux (nage sous l'eau).

L'affinité de la myoglobine pour l'oxygène est, comme l'a démontré R. HILL, intermédiaire entre celles des hémoglobines et des oxydases pour le même corps, de sorte que ces pigments peuvent emprunter l'oxygène aux premières pour le transmettre aux secondes. Là encore, les myoglobines peuvent constituer des réserves d'une très grande efficacité physiologique.

III. — Objet du travail.

L'exposé qui vient d'être fait permet de se rendre compte que, si des résultats importants sont déjà acquis dans l'étude des myoglobines, celle-ci n'en est pas moins incomplète. Il ne saurait en être autrement étant données, d'une part la brièveté de la période depuis laquelle la préparation des myoglobines pures a été réalisée, et d'autre part les difficultés mêmes de cette préparation.

Nous nous sommes proposés d'apporter une contribution à l'étude du pigment musculaire, en nous attachant principalement à combler les lacunes qui paraissent les plus grandes dans ce domaine, nous guidant en cela sur les résultats obtenus par les recherches antérieures sur les hémoglobines sanguines.

La première de nos préoccupations a été la mise au point d'une technique permettant d'obtenir avec certitude, dans des conditions expérimentales précises, une myoglobine pure à partir d'un extrait musculaire.

Cette étape, une fois franchie, nous avons déterminé le poids moléculaire du produit obtenu, les données publiées à cet égard étant contradictoires, bien que toutes aient été déterminées par la même méthode (ultra centrifugation).

Ceci fait, sachant d'une part que chez un même animal l'hémoglobine du sang et celle du muscle ont des propriétés différentes, et d'autre part, que les diverses hémoglobines sanguines ne sont pas identiques, nous avons essayé de mettre en évidence les caractères spécifiques des myoglobines, tant vis-à-vis des hémoglobines qu'entre les pigments musculaires de diverses espèces animales. Nous avons choisi com-

me test de spécificité la solubilité de ces divers corps dans des milieux de concentrations croissantes en un sel neutre, à l'étude de laquelle nous avons appliqué l'équation de E. J. COHN [11].

Ayant ainsi différencié par des constantes physico-chimiques les pigments musculaires et sanguins d'une même espèce et les pigments musculaires de diverses espèces entre eux, nous avons cherché de relier la spécificité de chacun à la composition en acides aminés de sa globine. Nous espérons par ailleurs, à l'aide des données ainsi obtenues, pouvoir calculer selon la méthode de BERGMANN et NIEMANN [6] le poids moléculaire de ces corps et comparer ainsi les valeurs obtenues par voie chimique à celles déterminées par les méthodes physiques.

L'objet de notre travail est donc la mise au point de méthodes de préparation des myoglobines, la détermination de leur poids moléculaire et l'étude de leur spécificité, basée sur celle de leur solubilité en présence de sels neutres et de leur composition en acides aminés.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nous avons tout d'abord établi un procédé de préparation permettant d'obtenir à coup sûr une myoglobine *pure* à partir de muscle cardiaque ou squelettique des divers mammifères. Ceci fait, nous avons étudié successivement, dans le but de définir certains caractères de ces corps et, éventuellement, de mettre en évidence leur spécificité, certaines de leurs propriétés. Nous avons déterminé la teneur des myoglobines en divers acides aminés et leur poids moléculaires par une voie chimique (BERGMANN et NIEMANN [6]) et par osmométrie (ADAIR) [1].

Nous examinerons successivement les résultats de ces diverses recherches avant d'en faire une discussion générale.

A. — Partie expérimentale.

I. — PRÉPARATION DES MYOGLOBINES.

La préparation décrite par THEORELL [37] et la modification qu'en a proposé MORGAN [22] permettent d'obtenir de la myoglobine de Cheval cristallisée, mais leur application aux muscles d'autres animaux s'est révélée moins satisfaisante. Un mode opératoire très récemment décrit par ROSSI [34] dérivé de celui de THEORELL n'a pas pu être expérimenté à cet égard. Nous avons établi une méthode générale de préparation de ces pigments, basée sur le principe proposé par ROCHE, DERRIEN et MOUTTE [30] pour l'obtention des hémoglobines pures.

Du muscle cardiaque ou squelettique, finement haché à l'aide d'un broyeur mécanique, est mis à macérer douze heures à 0° dans trois fois son poids d'eau distillée. L'extrait ainsi obtenu renferme des protéines musculaires et sanguines diverses et de la myoglobine. Cette dernière est beaucoup plus soluble que les autres constituants protéiques du milieu en présence de sels neutres à forte concentration (MORGAN). Sa séparation et sa purification sont alors opérées par la méthode permettant d'isoler les hémoglobines pures des hémolysats globulaires. On établit sur l'extrait musculaire une courbe de solubilité, à pH = 6,8 et à 20°, des diverses protéines qu'il contient, en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium. Cette opération est réglée de manière à ce que vingt points expérimentaux environ permettent

de délimiter avec une précision suffisante la marge de concentration dans laquelle a lieu la précipitation (relargage) de chaque constituant du mélange. Le dosage de l'azote protéique non précipité est fait dans chaque échantillon selon la microméthode d'A. ROCHE et MARQUET [31]. On trouvera ci-dessous (Tableau I) un exemple des données expérimentales déterminées au cours d'une telle opération, données à partir desquelles a été établie la figure 1 (A et B).

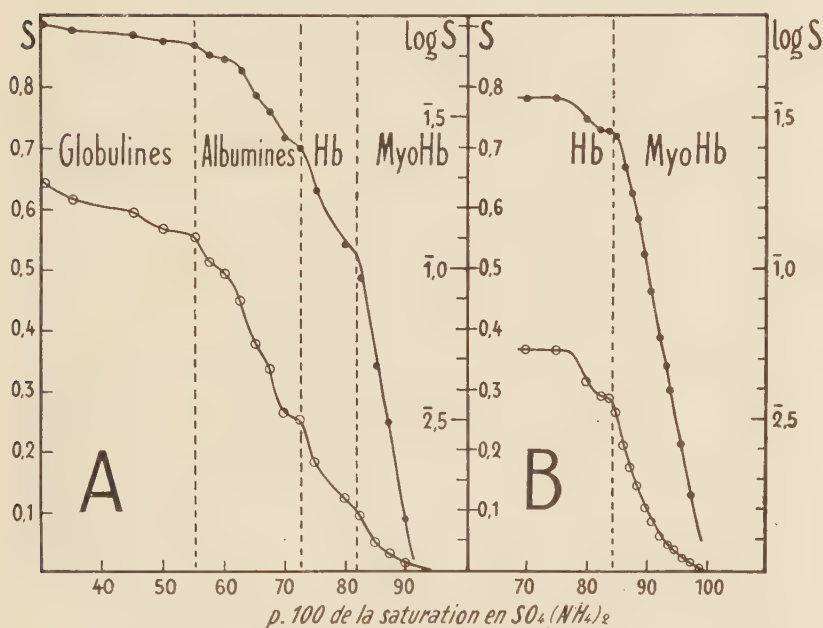


FIGURE 1. — Variations de la solubilité (S) des protéines de l'extrait musculaire total (A) ou fractionné par précipitation à 70 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium à pH = 6,8 (B).

Courbes o — o : variations de S.

Courbes ● — ● : variations de $\log S$.

Abscisses : p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium.

Ordonnées : S, exprimé en g. d'azote protéique p. 1000 cm^3 , et $\log S$.

TABLEAU I.

Courbe de relargage d'un extrait musculaire de Cheval par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,6 et à 25°.
Temps d'équilibration : 15 heures.

Numéros des tubes...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration } } p. 100 de la } saturation.	3,00	3,60	4,20	4,80	5,40	6,00	6,30	6,60	6,90	7,20	7,50
	25	30	35	40	45	50	52,5	55	57,5	60	62,5
S (g. N p. 1000..... Microkjeldahl	0,706	0,646	0,618	0,666	0,596	0,568	0,616	0,554	0,514	0,494	0,451
Log. S	1,849	1,811	1,791	1,824	1,776	1,754	1,790	1,743	1,711	1,694	1,654
Numéros des tubes...	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Concentration } } p. 100 de la } saturation.	7,80	8,10	8,40	8,70	9,00	9,60	9,90	10,20	10,50	10,80	
	65	67,5	70	72,5	75	80	82,5	85	87,5	90	
S (g. N p. 1000)..... Microkjeldahl	0,378	0,337	0,266	0,252	0,184	0,122	0,094	0,049	0,038	0,015	
Log. S	1,577	1,528	1,441	1,407	1,765	1,084	2,973	2,690	2,505	2,47	

L'examen de la figure 1 permet de se rendre compte de deux faits importants, à savoir : d'une part la précipitation de myoglobine pratiquement pure entre 82,5 et 95 pour 100 de la saturation en sulfate d'ammonium et d'autre part la précipitation du mélange à des concentrations en sels moindres. A cet égard l'extrait musculaire est comparable au sérum dont le relargage suivant le même principe a été particulièrement étudié par BUTLER et MONTGOMERY [9], A. ROCHE, DORIER et SAMUEL [29], J. ROCHE, DERRIEN et CHOUAÏECH [27]. On peut affirmer que le segment de la courbe de relargage correspondant à des forces ioniques supérieures à 9,90 traduit la précipitation d'une protéine pure. En effet, les variations de $\log. S$ en fonction de $\Gamma/2$ forment une droite à partir de $\Gamma/2 > 9,90$, comme le prévoit la relation de COHN pour les corps purs. A partir de $\Gamma/2 = 9,90$, dans les conditions de l'expérience, la myoglobine est la seule protéine de l'hémolysat restant en solution. Il suffit donc, pour préparer une solution de pigment pur, d'enrichir l'extrait musculaire en sel neutre jusqu'à cette concentration critique et de filtrer les impuretés protéiques qui précipitent alors. Toutes ces opérations doivent être réalisées en se maintenant au voisinage du point isoélectrique du pigment, soit à $pH = 6,8$. Il va sans dire que la concentration en sel neutre qu'il faut réaliser pour procéder à ce fractionnement varie suivant la concentration en protéines des extraits et d'une espèce animale à l'autre. Aussi, en pratique, n'obtient-on des résultats satisfaisants qu'en déterminant sur un échantillon de chaque extrait une courbe de solubilité à partir de laquelle on détermine la concentration en sel permettant de précipiter les protéines autres que la myoglobine.

La solution de myoglobine ainsi obtenue n'est jamais rigoureusement pure. Il convient dans un premier temps d'isoler la totalité des protéines qu'elle renferme afin d'en préparer une solution concentrée, puis de fractionner la myoglobine suivant le principe qui a permis une première purification grossière de ce corps. Pour cela, la solution filtrée à la fin des opérations précédentes est saturée de sulfate d'ammonium à $\text{pH} = 6,8$. On recueille le précipité par centrifugation ou filtration et on le dissout dans le minimum d'eau distillée. Ceci fait, on détermine sur une partie aliquote de la solution une courbe de solubilité des protéines qu'elle contient, à $\text{pH} = 6,8$. Si les quantités de protéines demeurent en solution suivant une fonction exponentielle de $r/2$, il y a lieu d'admettre que le milieu ne contient que de la myoglobine pure. Dans le cas contraire la courbe est constituée par plusieurs fragments d'exponentielles dont un seul, celui correspondant à la protéine soluble aux concentrations en sel les plus élevées correspond à la myoglobine. Pour débarrasser celle-ci des impuretés les moins solubles qui l'accompagnent, il suffit de répéter l'opération ayant permis la première purification, à savoir : enrichir le milieu en sulfate d'ammonium à $\text{pH} = 6,8$ pour réaliser la concentration en sel correspondant au début de précipitation de la myoglobine dans le milieu.

On répète cette opération autant de fois qu'il est nécessaire pour que l'on obtienne un produit pur dont la solubilité en fonction de la concentration en sel soit une fonction exponentielle simple et répondant à la relation de COHN que nous discuterons plus bas (voir page 60). On trouvera dans les tableaux II et III et dans la figure 1 un ensemble de données illustrant la suite de ces opérations.

TABLEAU II.

*Retargage d'une myométhémoglobine de bœuf impure par
une solution de sulfate d'ammonium à concentration crois-
sante à pH = 6,5 et à 22°.*
Temps d'équilibration : 15 heures.

Numéros des tubes.....	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration { F/2.....	9,60	9,75	9,90	10,05	10,20	10,35	10,50	10,65
en sel { p. 100 de la saturation...	80	81,25	82,50	83,75	85	86,25	87,50	88,75
S (g. N p. 1000).....	0,324	0,310	0,305	0,305	0,260	0,230	0,178	0,146
Photométrie								
Log. S			1,485	1,485	1,415	1,362	1,250	1,165
S (g. N p. 1000).....	0,318	0,317	0,293	0,291	0,277	0,205	0,173	0,147
Kjeldahl.....								
Log. S					1,443	1,312	1,239	1,168

TABLEAU II (suite).

Numéros des tubes	9	10	11	12	13	14	15	16
Concentration $\left\{ \begin{array}{l} \Gamma/2 \\ \text{p. 100 de la saturation} \end{array} \right.$ en sel	10,80 90	10,95 91,25	11,10 92,50	11,25 93,75	11,40 95	11,55 96,25	11,70 97,50	11,88 99
S (g. N p. 1000).....	0,407	0,083	0,061	0,048	0,063	0,028	0,018	0,011
Log. S Photométrie	1,030	2,920	2,786	2,682	2,634	2,448	2,556	2,009
S (g. N p. 1000).....	0,116	0,084	0,059	0,040		0,026	0,018	0,010
Log. S Kjeldahl	1,065	2,928	2,773	2,603		2,424	2,556	2,022

TABLEAU III.

Relargage d'une myométhémoglobine de bœuf, par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante à pH = 6,6 et à 21°.
Temps d'équilibration : 16 heures.

Numéro des tubes.....	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration { $\Gamma/2$	9,00	9,60	9,75	9,90	10,05	10,20	10,35	10,50
en sel { p. 100 de la saturation...	75	80	81,25	82,50	83,75	85	86,25	87,50
S (g. N p. 1000).....	0,568	0,558	0,530	0,490	0,436	0,350	0,293	0,215
Microkjeldahl	1,755	1,747	1,725	1,691	1,640	1,545	1,468	1,333
Log. S								
S (g. N p. 100).....	0,560	0,540	0,520	0,480	0,422	0,357	0,280	0,214
Photométrie								
Log. S	—	1,73	1,717	1,682	1,627	1,553	1,448	1,334

TABLEAU III (suite).

Numéro des tubes	9	10	11	12	13	14	15	16
Concentration { $\Gamma/2$ en sel { p. 100 de la saturation...	10,65 88,75	10,80 90	10,95 91,25	11,10 92,50	11,25 93,75	11,40 95	11,55 96,25	11,75 97,75
S (g. N p. 1000).....	0,473	0,428	0,402	0,078	0,057	0,043	0,029	0,022
Microkjeldahl	1,239	1,408	1,010	2,895	2,755	2,632	2,460	2,350
Log. S.....								
S (g. N p. 100).....	0,472	0,428	0,405	0,083	0,061	0,046	0,032	0,024
Photométrie								
Log. S.....	1,236	1,408	1,022	2,920	2,786	2,663	2,506	2,322

Signalons qu'il convient, au début et pendant les opérations, de saturer les milieux d'oxyde de carbone si on veut éviter la méthémoglobinisation du pigment.

Cette méthode est laborieuse mais elle permet d'obtenir *à coup sûr* des corps purs ; elle n'exige pas la perfusion préalable des organes. Un rendement satisfaisant n'est obtenu qu'à la condition d'opérer sur cinq kilos de muscles au moins. Certaines de nos préparations ont pu être réalisées sur des quantités de l'ordre de trente kilos grâce à l'obligeance des services vétérinaires des Abattoirs de Marseille et de Lyon que nous tenons à remercier ici.

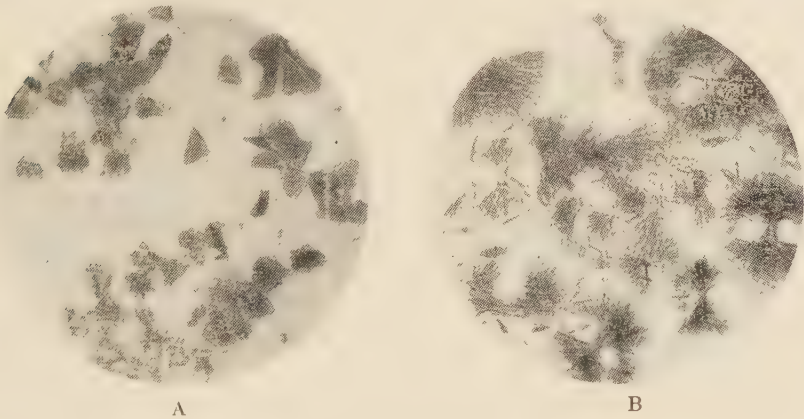


FIGURE 2. — *Myoglobine cristallisée* ; A, de Bœuf ; B, de Cheval ($\times 200$).

Nous avons préparé les myoglobines du Mulet, de l'Ane, du Bœuf, du Cheval, du Chien, du Mouton et du Porc. Les pigments des quatre premiers animaux ont été obtenus à l'état cristallisé par l'enrichissement progressif de leur solution en sulfate d'ammonium (addition de sel ou dialyse contre une solution

saturée en celui-ci). Ceux des autres animaux n'ont pu être préparés qu'à l'état amorphe. Il convient de signaler par ailleurs que le pigment de Cheval cristallise avec beaucoup plus de facilité que celui du Bœuf. On trouvera dans la figure 2 ci-dessus des microphotographies de myoglobines de Bœuf et de Cheval cristallisées que nous remercions Monsieur le Professeur POLICARD d'avoir fait exécuter dans son service.

Les caractères cristallographiques de ces myoglobines sont notablement différents de ceux des hémoglobines contenues dans les hématies des mêmes animaux. La myoglobine du Cheval se présente en courtes aiguilles groupées en pinceaux ou en gerbes, qu'elle provienne de muscle squelettique ou cardiaque, de même celle de l'Ane et du Mulet. Nos préparations sont à cet égard identiques à celles obtenues par THEORELL, MORGAN, ROSSI. La myoglobine de Bœuf cristallise en tablettes triangulaires d'un aspect caractéristique, non décrites jusqu'ici. Selon une communication personnelle de ROSSI, la myoglobine du Porc présente une forme cristalline différente de celle du Cheval. Ces premiers résultats permettent en eux-mêmes de penser que les myoglobines des divers mammifères présentent des caractères spécifiques.

II. — SOLUBILITÉ DES MYOGLOBINES DANS LES SOLUTIONS SALINES CONCENTRÉES.

Depuis près d'un siècle, à la suite des recherches du physiologiste danois PANUM, de nombreux auteurs ont pris comme test d'individualité des protéines leur solubilité dans des milieux renfermant des sels neutres à diverses concentrations. Il est classique par

exemple de considérer comme globulines les protéines précipitant à la demi-saturation en sulfate d'ammonium. On s'est rapidement rendu compte que ce mode de caractérisation n'était pas extrêmement précis et l'on a cherché à établir un critère de pureté des diverses protéines, beaucoup plus rigoureux, basé sur une étude plus approfondie de leur solubilité. On trouvera dans la thèse de M. MOUTTE [23] un exposé d'ensemble des travaux poursuivis dans ce but, lesquels ont abouti à l'établissement de la relation de COHN [11]. C'est l'application de celle-ci à l'étude comparée des hémoglobines et des myoglobines à laquelle nous nous sommes attachés.

La relation de COHN s'exprime par l'équation $\text{Log } S = \beta - K' \cdot \Gamma/2$, laquelle permet de définir la solubilité S d'une protéine, exprimée en gramme par 1.000 cm³ de solution, en fonction de la force ionique $\Gamma/2$, aux constantes β' et K' près (1). Dans cette formule β' est égal à la valeur de $\log S$ pour $\Gamma/2 = 0$. Déterminé par extrapolation il correspond théoriquement à la solubilité du produit étudié dans le milieu aqueux pur. L'expérience a montré que sa valeur est variable avec la température et le pH du milieu pour une protéine et un sel neutre déterminés. K' , coefficient angulaire de la droite, traduisant les variations de $\text{Log } S$ en fonction de $\Gamma/2$, est au contraire indépendant du pH et de la température. Désignée en général sous le nom de constante de solubilité, sa valeur permet de caractériser une protéine dont on étudie la solubilité dans un milieu aqueux

(1) La force ionique $\Gamma/2$ est dans cette équation substituée à la concentration stœchiométrique en sel neutre. Γ est la somme de concentration des ions du sel, multipliée par le carré de leur valence $\Gamma/2 = 1/2 \sum C Z^2$, c étant la molarité stœchiométrique de chaque ion et Z sa valence.

renfermant un sel neutre déterminé, car les protéines présentent dans des milieux renfermant un même sel neutre des valeurs diverses de K' .

La relation de COHN ne s'applique avec validité qu'à des corps purs. En effet, pour que les variations de $\text{Log } S$ en fonction de $\Gamma/2$ forment une droite il convient que la solubilité S diminue en fonction de $\Gamma/2$ selon une loi exponentielle ; or, nous l'avons vu plus haut, ceci n'est réalisé que dans le cas d'un corps pur. De ce fait, la relation de COHN ne permet pas seulement d'établir une constante physicochimique caractéristique du produit désigné, mais elle permet aussi d'établir un test de pureté de celui-ci.

Ayant préparé des hémoglobines pures ROCHE, DERRIEN et MOUTTE [28] ont déterminé sur elles les valeurs de K' et de β en présence de sulfate d'ammonium, ou d'un mélange équimoléculaire de phosphates mono et di-potassique de $\text{pH} = 6,5$ à diverses températures et obtenu des résultats que nous reproduisons dans le tableau suivant où l'on trouvera réunies les valeurs relatives à la dissolution de corps cristallisés et au relargage des mêmes espèces en solution.

TABLEAU IV.

Constantes K' , et β' de l'équation de COHN pour les carboxy-hémoglobines et les méthémoglobines sanguines de diverses espèces animales en présence de sulfate d'ammonium ou de phosphates de potassium aux pH et aux températures indiquées ci-dessous.

Espèce animale et N° des courbes		Relargage (R) ou dissolution de cristaux (C)	B'	K's	pH	T°c
<i>Sulfate d'ammonium.</i>						
COHb	Cheval 2 A . .	C	2,42	0,71	6,60	22°0
	Cheval 2 B...	R	3,34	0,70	6,30	22°0
	Homme 11...	R	11,85	1,56	6,55	22°0
	Lapin 14 A...	C	10,50	1,34	6,60	22°0
	Lapin 14 B...	R	12,51	1,34	6,80	13°5
	Porc 16.....	C	7,65	1,12	6,50	22°0
	Requin 18...	R	7,33	0,88	6,80	25°0
	Tortue 17....	R	5,72	0,80	6,77	22°0
Methb	Chien 6 A...	C	3,17	0,73	6,60	22°0
	Chien 6 B...	R	12,35	1,72	6,60	22°0
	Homme 12...	R	11,94	1,57	6,55	22°0
<i>Phosphates mono et dipotassique.</i>						
COHb	Bœuf 8.....	R	10,18	1,82	6,50	37°0
	Cheval 1 A...	C	2,37	1,01	6,55	22°0
	Cheval 1 B...	R	4,02	1,04	6,55	22°0
	Chien 7 A...	C	8,59	1,83	6,50	22°0
	Chien 7 B...	R	10,09	1,82	6,54	21°0
	Homme 9.....	R	12,54	2,33	6,50	22°0
	Lapin 13.....	R	12,25	2,10	6,50	22°0
	Mulet 3.....	C	2,28	1,02	6,50	22°0
	Porc 15 A...	C	9,19	1,77	6,50	22°0
	Porc 15 B...	R	9,96	1,79	6,50	22°0
Methb	Bœuf 4.....	R	13,51	2,38	6,50	22°0
	Chien 5 A...	C	9,60	2,04	6,50	22°0
	Chien 5 B...	R	20,00	3,54	6,58	22°0
	Homme 10...	R	12,46	2,33	6,49	22°0

Ceci étant nous avons pensé que l'on pourrait d'une part, différencier la myoglobine de l'hémoglobine d'un même animal et, d'autre part, mettre en évidence la spécificité des myoglobines de divers mammifères, en étudiant leur solubilité dans des milieux de concentration croissante en sulfate d'ammonium afin d'appliquer la relation de COHN aux résultats obtenus. Un seul travail, dû à MORGAN, a précédé le nôtre dans ce domaine. Pour cet auteur la valeur de K' en présence de sulfate d'ammonium serait très légèrement différente à $\text{pH} = 6,6$ et à 25° pour les pigments musculaires et sanguins du Cheval (0,83 pour le premier et 0,71 pour le second). Signalons toutefois que les résultats expérimentaux de MORGAN présentent des écarts importants d'une préparation à l'autre. C'est pourquoi nous avons cru devoir reprendre cette étude et l'étendre aux myoglobines et aux hémoglobines du Bœuf et du Chien. Nous l'avons fait dans les deux cas sur des pigments totalement méthémoglobinisés par le ferricyanure de potassium dont nous avons étudié la solubilité (relargage de corps dissous et dissolution de cristaux) en présence de sulfate d'ammonium à $\text{pH} = 6,5$ et à 21° . En raison de la solubilité exceptionnellement élevée des myoglobines dans des milieux de force ionique très grande, le sulfate d'ammonium est le seul sel neutre se prêtant à cette étude alors que les phosphates de potassium avaient pu être employés dans le cas des hémoglobines. On trouvera dans les tableaux V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII et XIII le détail de nos résultats, à partir desquels ont été établies les figures 3 et 4.

TABEAU V.
Relargage d'une myométhémoglobine de Cheval par une
solution de sulfate d'ammonium à concentration crois-
sante, à pH = 6,7 à 19°.

Temps d'équilibration : 16 heures.

Numéro des tubes.....		1	2	3	4	5	6	7
Concentration en sel	1/2.....	5,40	6,00	6,60	7,20	7,80	8,40	8,70
	p. 100 de saturation	45	50	55	60	65	70	72,5
S (g. N p. 1000).....		0,330	0,295	0,290	0,290	0,290	0,300	0,290
Log. S.....								
Numéro des tubes.....		8	9	10	11	12	13	
Concentration en sel	1/2.....	9,00	9,30	9,60	9,90	10,20	10,50	
	p. 100 de saturation	75	77,5	80	82,5	85	87,5	
S (g. N p 1000).....		0,290	0,285	0,227	0,170	0,072	0,027	
Log. S.....								
Microkjeldahl								
.....		1,516	1,455	1,356	1,231	2,857	2,432	

TABLEAU VI.
Redissolution de cristaux d'une myométhémoglobine de Cheval par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,6 et à 22°.
Temps d'équilibration : 16 heures.

Numéro des tubes.....		1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en sel	{ $\Gamma/2$ p. 100 de la saturation...	2,1	2,4	3	3,3	3,6	3,9	4,2	4,5
		17,50	20	25	27,50	30	32,50	35	37,50
S (g. N p. 100).....	Photométrie	0,575	0,575	0,572	0,512	0,457	0,332	0,265	0,17
I og. N.				1,758	0,716	1,660	1,520	1,420	1,240
.....		9	10	11	12	13	14	15	16
Concentration en sel	{ $\Gamma/2$ p. 100 de la saturation...	4,8	5,1	5,4	5,7	6	6,3	6,6	6,9
		40	42,5	45	47,50	50	52,50	55	57,50
S (g. N p. 100).....	Photométrie	0,127	0,068	0,0382	0,024	0,014	0,009	0,0055	0,0035
Log. N.		1,030	2,832	2,582	2,376	2,162	3,950	3,730	3,550

TABLEAU VII.

Relargage d'une myométhémoglobine de Chien par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6.5 et à 22°.

Temps d'équilibration : 17 heures.

Numéro des tubes.....	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en sel								
{ $\Gamma/2$	10,71	10,86	11,01	11,16	11,31	11,46	11,61	11,76
{ p. 100 de la saturation...	89,25	90,50	91,75	93	94,25	95,50	96,75	98
S (g. N p. 1000).....	0,384	0,383	0,337	0,260	0,213	0,145	0,1164	0,092
Microkjeldahl								
Log. S.....	1,584	1,584	1,528	1,415	1,329	1,151	1,067	2,965
S (g. N p. 1000).....	0,367	0,359	0,320	0,259	0,206	0,147	0,119	0,096
Photométrie								
Log. S.....	1,555	1,556	1,506	1,414	1,315	1,168	1,076	2,983

TABLEAU VIII.
Redissolution d'une méthémomyoglobine cristallisée de Bœuf
par une solution de sulfate d'ammonium à concentration
croissante, à pH = 6,6 et à 22°5.
 Temps d'équilibration : 15 heures.

Numéro des tubes.....	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en sel { $\Gamma/2$ p. 100 de la saturation...	8,796 73,3	9,00 75	9,192 76,6	9,396 78,3	9,60 80	9,792 81,6	9,996 84	10,320 86
S (g. N p. 1000)..... Microkjeldahl	0,434	0,392	0,310	0,190	0,158	0,120		0,060
Log. S.....		1,594	1,492	1,280	1,200	1,080		1,780
S (g. N p. 1000)..... Photométrie	0,422	0,382	0,290	0,188	0,128	0,096	0,0546	0,035
Log. S.....		1,583	1,463	1,275	1,108	2,983	2,730	2,545

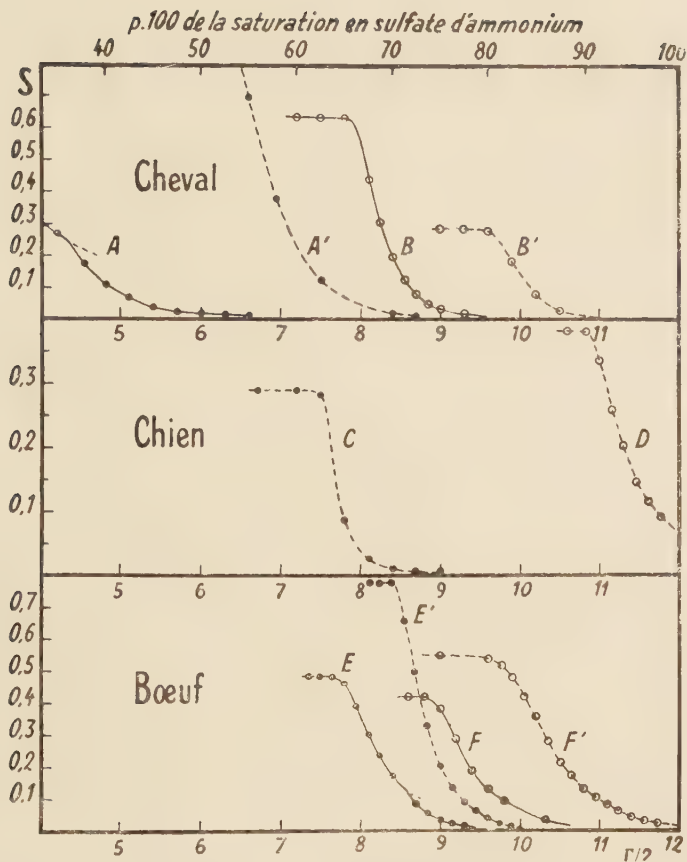


FIGURE 3. — Variations de la solubilité S de méthémoglobines musculaires (O : B-B', D, F-F') et sanguines (O : A-A', C, E-E') pures de Boeuf, de Cheval et de Chien à pH = 6,5-6,6 et à 21° en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium.

Courbes : S de cristaux (C), Courbes : S de produits amorphes (relargage, R.).

Abscisses : en haut, pour cent de la saturation en sulfate d'ammonium ; en bas, force ionique $I/2$ p. 1000 cm³. Ordonnées : S = grammes d'azote protéique p. 1000 cm³ de solution.

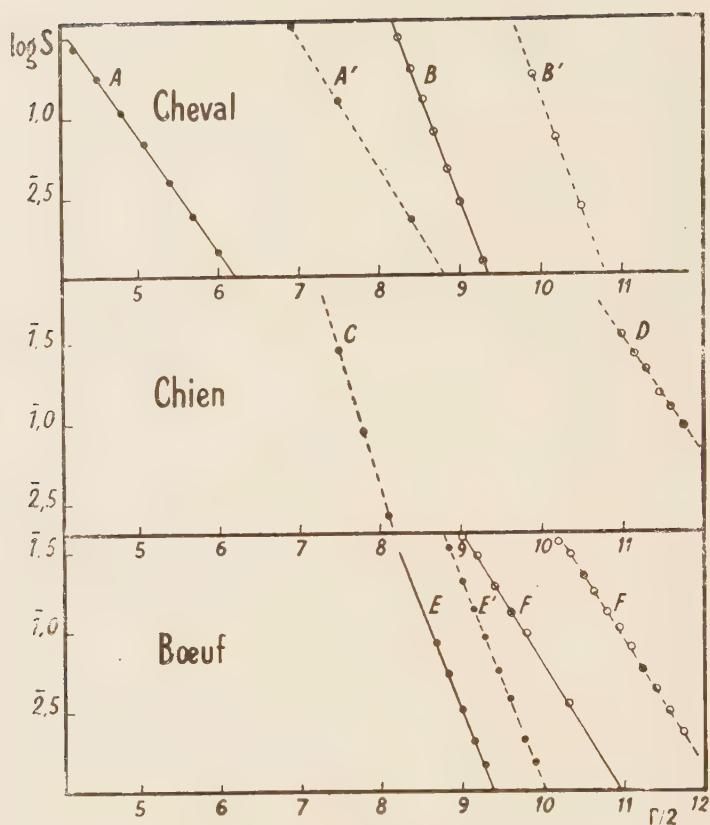


FIGURE 4. — Variations de $\log S$ de méthémoglobines musculaires (O : B-B', D, F-F') et sanguines (O : A-A', C, E-E') pures de Boeuf, de Cheval et de Chien à $\text{pH} = 6,5$ et à 21° en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium.

Courbes : $\log S$ de cristaux (C). Courbes : $\log S$ de produits amorphes (relargage, R).

Abscisses : concentration en sulfate d'ammonium exprimée en force ionique $\Gamma/2$ p. 1000 cm^3 . Ordonnées : $\log S$.

TABLEAU IX.

Relargage d'une carboxyhémoglobine de Cheval par une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,50 et à 22°.

Temps d'équilibration : 18 heures.

Numéro des tubes....										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration en sel } $\Gamma/2$	4,80	6,00	6,30	6,60	6,90	7,50	8,40	8,70		
p. 100 de la saturation ..	40,00	50,00	52,50	55,00	57,50	62,50	70,00	72,50		
S (g. N p. 1000).....	1,139	1,314	1,456	0,694	0,381	0,125	0,022	0,004		
Log. S			0,063	4,844	4,582	4,097	2,356	3,620		
Microkjeldahl										

(1) Les dernières recherches sur la solubilité des hémoglobines de Cheval dans les sels neutres ayant montré que les constantes de solubilité K_s et β' de la carboxyhémoglobine et de la méthémoglobine étaient identiques dans les mêmes conditions d'expérience, nous avons choisi, parmi les documents tirés de la thèse de M. MORTRE [23], cette courbe de carboxyhémoglobine de Cheval dans le but de la comparer à la myométhémoglobine de ce même animal, comme étant le meilleur document en notre possession.

TABLEAU X.
Redissolution de cristaux de méthémoglobine de bœuf cristallisée dans une solution de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH = 6,62 et à 22°5.
 Temps d'équilibration : 17 heures.

Numéro des tubes.....	1	2	3	4	5	6	7
Concentration { $\Gamma/2$ en sel { p. 100 de la saturation.....	7,50 62,50	7,65 63,75	7,80 65	7,95 66,25	8,10 67,50	8,25 68,75	8,40 70
S (g. N p. 1000)..... Log. N..... Photométrie	0,484	0,484	0,456	0,390	0,315	0,221	0,173
1,591	1,481	1,344	1,248				
Numéro des tubes.....	8	9	10	11	12	13	
Concentration { $\Gamma/2$ en sel { p. 100 de la saturation.....	8,55 71,25	8,70 72,50	8,85 73,75	9,00 75	9,15 76,25	9,30 77,50	
S (g. N p. 1000)..... Log. N..... Photométrie	0,412	0,4085	0,4056	0,4034	0,40225	0,4019	
1,050	2,930	2,749	2,535	2,353	2,281		

TABLEAU XI.
Relargage d'une méthémoglobine de chien par une solution
de sulfate d'ammonium à concentration constante, à pH
= 6,5 et à 22°.
 Temps d'équilibration : 24 heures.

Numéro des tubes.....	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration } } p. 100 de la saturation...	6,90 57,50	7,20 60,00	7,50 62,50	7,80 65,00	8,10 67,50	8,40 70,00	8,70 72,50	9,00 75,00
S (g. N p. 1000).....	0,290	0,290	0,283	0,085	0,026	0,068	0,002	0,0006
Log. S.....			1,453	2,930	2,416	3,904	3,998	

TABLEAU XII.

*Relargage d'une méthémoglobine de bœuf par une solution
de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à pH
= 6,7 et à 24°.*

Temps d'équilibration : 16 h. 30

Numéro des tubes.....		1	2	3	4	5	6
Concentration en sel	} $\Gamma/2$ p 100 de la saturation.....	8,20	8,35	8,50	8,65	8,80	8,95
		68,036	69,286	70,536	71,786	73,036	74,286
S (g. N p. 1000).....		0,843	0,835	0,655	0,501	0,329	0,205
Log. N.....	} Photométrie			1,816	1,700	1,517	1,312
		7	8	9	10	11	12
Numéro des tubes.....							
Concentration en sel	} $\Gamma/2$ p. 100 de la saturation.....	9,10	9,25	9,40	9,55	9,70	9,85
		75,536	76,786	78,036	79,286	80,536	81,786
S (g. N. p. 1000).....		0,134	0,090	0,055	0,042	0,018	0,015
Log. S..	} Photométrie	1,127	2,955	2,743	2,630	2,276	2,176

TABLEAU XIII.

*Dissolution de cristaux d'une méthémoglobine de cheval
cristallisée par une solution de sulfate d'ammonium à con-
centration croissante, à pH = 6,5 et à 22°.
Temps d'équilibration : 16 heures.*

Numéro des tubes.....		1	2	3	4	5	6
Concentration en sel	} $\Gamma/2$ p. 100 de la saturation	7,20	7,50	7,80	8,10	8,25	8,40
		60	62,5	65	67,5	68,75	70
S (g. N. p. 1000).....		0,704	0,630	0,652	0,434	0,276	0,198
Log. N.....					1,638	1,442	1,297
S (g. N. p. 1000).....		0,630	0,630	0,630	0,438	0,306	0,194
Log. N.....					1,642	1,486	1,288

TABEAU XIII (suite)

Numéros des tubes.....		7	8	9	10	11	12
Concentration en sel	$\Gamma/2$	8,55	8,70	8,85	9,00	9,30	9,60
	p. 100 de la saturation	71,25	72,5	73,75	75	77,5	80
S (g. N. p. 1000).....		0,439	0,093	0,057	0,033	0,0106	0,009
Log. N.....		1,443	2,970	2,757	2,519	2,025	
S (g. N. p. 1000)		0,426	0,079	0,047	0,0288	0,014	0,006
Log. N.....		1,400	2,901	2,673	2,460	2,096	

L'examen de ces documents fait apparaître plusieurs faits relatifs aux myoglobines et permettent de les comparer aux hémoglobines.

D'une part, la myoglobine est toujours soluble à une concentration en sel neutre beaucoup plus élevée que l'hémoglobine chez un même animal. D'autre part les trois myoglobines étudiées ont à cet égard une solubilité très différente, premier indice de leur spécificité. Enfin, comme ROCHE, DERRIEN et MOUTTE [28] l'ont déjà constaté pour les hémoglobines, chaque pigment cristallisé est beaucoup moins soluble que le même corps amorphe (relargage), ce qui semble tenir à l'état de coacervation des protéines dans leurs cristaux (DUCLAUX).

Nous avons appliqué la relation de COHN aux données obtenues afin de calculer les valeurs de $K's$ et de β' que l'on trouvera réunies dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV.

Valeurs des constantes $K's$ et β' de l'équation de COHN pour les hémoglobines sanguines et musculaires (à l'état de méthémoglobine) de Bœuf, de Cheval et de Chien en présence de sulfate d'ammonium, à 21° et à pH = 6,6-6,3.

Nature du pigment	Etat cristallisé (C) ou amorphe (R)	$K's$	β'	pH
Myoglobine de Bœuf.....	R	0,81	7,85	6,5
	C	0,79	6,80	6,5
Myoglobine de Cheval...	R	1,37	12,81	6,5
	C	1,38	10,88	6,5
Myoglobine de Chien....	R	0,75	7,78	6,5
Hémoglobine de Bœuf...	R	1,27	10,47	6,5
	C	1,27	10,02	6,6
Hémoglobine de Cheval..	R	0,70	3,34	6,3
	C	0,71	2,42	6,5
Hémoglobine de Chien...	R	1,71	12,35	6,6

Les valeurs de K' , pratiquement identiques pour un même pigment cristallisé ou amorphe différent notablement pour l'hémoglobine et pour la myoglobine d'une espèce déterminée. De même celles de β' dans les conditions où nous sommes placés. Elles permettent donc de différencier sans conteste le pigment sanguin du pigment musculaire d'un animal. Mais, en outre, elles traduisent avec une netteté indiscutable la spécificité des trois myoglobines étudiées. Au regard des tests d'individualité que permet d'établir la relation de COHN, les myoglobines de Bœuf, de Cheval et de Chien apparaissent comme n'étant pas des corps identiques.

III. — COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES MYOGLOBINES.

Un ensemble de recherches poursuivies par ROCHE, DUBOULOZ et JEAN [30] a établi que la spécificité des hémoglobines repose sur la diversité de la composition de leur globine. Auparavant TIMAR avait pu constater que la teneur en soufre des hémoglobines des divers animaux pratiquement constante chez les sujets d'une même espèce sauf chez le Chien, présente une valeur particulière pour chacun des nombreux vertébrés étudiés (mammifères et oiseaux). Dans le cas particulier du Chien la teneur en soufre du pigment sanguin, invariable chez les animaux de race pure, présente des différences importantes chez les bâtards.

ROCHE, DUBOULOZ et JEAN ont établi d'une part, que la bande protéique du spectre ultraviolet des diverses globines n'est pas identique et décelé, d'autre part, des différences spécifiques dans la teneur des divers acides aminés. Des données du même ordre

ont par ailleurs été obtenues par SCHENCK, et plus récemment par BEACH, BERNSTEIN, HUMMEL, WILLIAMS et MACY [4]. Enfin, ROCHE et MOURGUE [32] ont apporté à cet ensemble de données un complément en ce qui concerne la valine, la leucine et l'alanine. Les différences les plus nettes portent sur les teneurs en cystéine, en méthionine, en leucine et en valine, sur lesquelles nous reviendrons au cours de la discussion des résultats.

On pouvait *a priori* considérer comme plausible, d'une part que les différences existant entre les impuretés des hémoglobines et celles des myoglobines tiennent à la diversité de leur constituant protéique et d'autre part, que les myoglobines des divers animaux ne doivent pas renfermer une même globine. Nous nous sommes posés ces questions dès le début de notre travail (1939). Depuis lors, la première seule, a fait l'objet d'une recherche indépendante de nos expériences. ROSSI et TRAVIA [35], puis ROSSI [34] ont préparé de la myoglobine de Cheval par une méthode très voisine de celle de THEORELL. Après six cristallisations successives le soufre et certains acides aminés ont été dosés dans ce pigment. On trouvera ci-dessous les résultats obtenus par ROSSI sur la myoglobine de Cheval, et ceux déterminés par cet auteur et par BLOCK sur l'hémoglobine du même animal.

L'examen du tableau XV fait ressortir des différences de composition très nettes entre les globines des deux pigments. Nous nous réservons de les commenter dans un prochain paragraphe, car si certaines des données obtenues par ROSSI sont voisines de celles obtenues par nous, d'autres s'en écartent passablement.

TABLEAU XV.

Constituants	Poids molé- culaire o ato- mique	Hémoglobine de Cheval				Myoglobine de Cheval	
		(Block)		(Rossi)		Poids p. 100	Mol. g. p. 100
		Poids p. 100	Mol. g. p. 100	Poids p. 100	Mol. g. p. 100		
Fer.	55	0,33	0,006	0,34	0,0061	0,34	0,0061
Soufre total.	32	0,39	0,0122	0,49	0,0153	0,47	0,0147
Soufre non cystéique.	32	0,284	0,0087	0,33	0,0103	0,37	0,0115
Arginine.	174	3,20	0,0184	3,60	0,0200	1,62	0,009
Histidine	155	7,50	0,048	9,50	0,060	9,07	0,058
Lysine	146	8,10	0,054	8,20	0,056	12,90	0,088
Cystéine.	121	0,40	0,0033	0,60	0,0049	0,38	0,0031

Nous avons étudié comparativement la teneur des trois myoglobines en divers acides aminés afin de nous rendre compte de l'existence éventuelle de différences spécifiques dans la composition des globines présentes dans ces pigments et dans celles des hémoglobines des mêmes animaux.

Ces globines ont été préparées à partir de myoglobines pures, au regard du critère que constitue la précipitation par le sulfate d'ammonium à concentration croissante suivant une fonction exponentielle. La méthode utilisée pour obtenir ces globines est celle d'ANSON et MIRSKY [3]. Les globines ont été soumises à l'hydrolyse sulfurique totale dans les conditions suivantes : environ un gramme de protéines sont placées avec 20 cm³ d'une solution de SO₄H₂ 6 N dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux ; on

porte à l'ébullition au bain de sable pendant trente-six heures. Au bout de ce temps on transvase quantitativement le liquide dans un tube de centrifugeuse de 250 cm³, puis on précipite l'acide sulfurique par de l'eau de baryte saturée à froid et introduite bouillante, on centrifuge, on recueille le liquide dans un ballon jaugé de 500 cm³, on lave le précipité au moins cinq fois avec 50 à 60 cm³ d'eau distillée bouillante. On réunit les eaux de lavage dans le ballon jaugé et on complète le volume à 500 cm³. On opère sur des parties aliquotes le dosage des divers acides aminés que nous avons étudiés sauf celui du tryptophane. Pour celui-ci, partiellement détruit par l'hydrolyse acide, il convient d'employer l'hydrolyse alcaline (1 gramme de protéines traité à l'ébullition par 20 cm³ de NaOH N pendant 20 heures). Nous avons dosé l'arginine par la méthode de WEBER modifiée par DUMAZERT et POGGI [13], l'histidine par celle de HANKE et KOESSLER [16] suivant la technique de BLOCK [8], la lysine par la méthode de KOSSEL [19], la tyrosine et la cystéine par la méthode de FOLIN et MARENZI [14 et 14 bis], le tryptophane par la méthode de KÖMM et BÖHRINGER [18] (d'après BLOCK), la leucine et la valine par la méthode de FROMAGEOT et MOURGUE [15], l'alanine par la méthode de DESNUELLE [12].

On trouvera dans le tableau ci-dessous l'ensemble de nos résultats auxquels nous avons joint à titre de comparaison ceux déterminés par VICKERY et WHITE [42], par ROCHE, DUBOULOZ et JEAN [30] sur les pigments sanguins des mêmes animaux.

Il est manifeste que d'une part, une myoglobine n'a pas la même composition que l'hémoglobine de la même espèce animale et d'autre part que les di-

TABLEAU XVI.

Teneur pour 100 en divers acides aminés des hémoglobines sanguines et musculaires de Bœuf, de Cheval et de Chien.

Acide aminé	Hémoglobine musculaire de			Hémoglobine sanguine de		
	Bœuf	Cheval	Chien	Bœuf	Cheval	Chien
Arginine.....	2,01	2,35	2,38	3,44	3,54	3,39
Histidine.....	11,70	8,48	10,61	7,81	7,94	8,25
Lysine.....	9,96	10,24	10,84	8,44	7,99	8,26
Cystéine.....	0,85	0,80	0,78	0,56	0,40	1,20
Tyrosine.....	2,98	2,28	1,17	3,25	3,38	3,49
Tryptophane..	3,72	4,06	3,75	2,30	2,41	2,92
Alanine.....	9,29	6,98	5,66	8,70	7,60	7,10
Leucine.....	13,92	17,73	13,26	15,70	19,10	15,00
Valine.....	4,08	4,54	4,35	8,90	9,70	7,10

verses myoglobines présentent entre elles des différences dans leur teneur en acides aminés dont nous examinerons plus bas les modalités. Nous sommes d'accord sur ce point avec Rossi, de même que sur la teneur de la plupart des acides aminés de l'hémoglobine de Cheval. Il faut faire cependant une exception pour la cystéine, le chiffre trouvé par Rossi étant plus faible que le nôtre, il correspond d'ailleurs au poids moléculaire de 34.000 adopté par cet auteur pour les myoglobines, puisqu'il a été établi qu'il ne peut y avoir qu'une molécule de cystéine par molécule de myoglobine. De même le taux de cystéine trouvé par nous correspond au poids moléculaire de

17.000, qui semble être la valeur à adopter définitivement depuis les derniers travaux de PEDERSEN et ceux poursuivis par nous au laboratoire [33].

Signalons encore un léger désaccord sur le chiffre de la teneur en arginine plus faible que le nôtre. Il peut être attribué au fait que la méthode de dosage employée par Rossi est très délicate et donne souvent des résultats trop bas dans les cas des petites concentrations en arginine.

IV. — POIDS MOLÉCULAIRE (Osmométrie).

Comme nous l'avons déjà signalé, il existe quelque incertitude au sujet du poids moléculaire de la myoglobine, le seul travail antérieur consacré à ce sujet est dû à THEORELL [38], il assigne au pigment cristallisé du Cheval un poids moléculaire de 33.000, à la suite de mesures par ultra-centrifugation. Or, par la suite SVEDBERG [36] a plusieurs fois fait état de déterminations faites par PEDERSEN à l'aide de la même méthode et suivant lesquelles le poids moléculaire du même pigment serait égal à 17.000. Nous avons déterminé par osmométrie le poids moléculaire de la myoglobine cristallisée de Cheval, de Bœuf, afin de contrôler la validité de l'une ou de l'autre de ces données. Nos déterminations ont été faites par la méthode osmométrique (ADAIR [1]).

Cette méthode a été appliquée à des solutions en équilibre osmotique à 0° avec des mélanges tampons de phosphates alcalins M/15 (SÖRENSEN) de pH = 6,82. Nos résultats ont été rassemblés dans le tableau ci-dessous où C désigne la concentration des solutions en protéines (g. pour 100 cm³), p la pression osmotique observée (exprimée en mm. Hg.), $\pi = \frac{P}{C}$ la

pression osmotique par unité de concentration et $\frac{M}{\Phi}$
 le poids moléculaire calculé au facteur Φ près. Φ
 $= \frac{\pi}{\pi_0}$; il est pratiquement égal à l'unité dans le cas
 considéré.

TABLEAU XVII.

*Pression osmotique et poids moléculaire de la myoglobine
 de Cheval cristallisée.*

Préparation n°	C	p	π	M/ Φ
I	2,33	24,85	10,66	15.970
III	1,75	16,32	9,32	18.270
I	0,95	9,74	10,25	16.610
II	0,93	8,83	9,45	18.020
II	0,68	6,72	9,88	17.240
III	0,57	6,17	10,87	15.670
III	0,26	2,55	9,80	17.380
				Moyenne 16.850

Le poids moléculaire de la myoglobine de Cheval est donc égal, aux erreurs d'expériences près, à 16.800, valeur très voisine de celle obtenue par PEDERSEN à l'aide d'une méthode essentiellement différente. Des résultats très voisins ont été obtenus au cours d'expériences poursuivies sur l'hémoglobine de Bœuf.

B. — Discussion des résultats.

L'ensemble des données expérimentales que nous avons déterminées doit être discuté à plusieurs points de vue. En effet, il permet d'une part de préciser les caractères spécifiques des myoglobines, tant entre elles que comparativement aux hémoglobines et, d'autre part, la constitution chimique des chromoprotéides musculaires ; ce sont là les deux points desquels nous discuterons plus particulièrement.

1. *Caractères généraux et spécificités des myoglobines.*

Divers travaux antérieurs rappelés dans l'Introduction permettaient de distinguer le pigment sanguin du pigment musculaire d'un même animal par l'étude de certaines de leurs propriétés (spectre, affinité pour les gaz, résistance à l'action des bases). *Nous apportons de nouveaux documents justifiant la séparation des hémoglobines et des myoglobines d'une même espèce animale.* Nous avons en effet constaté que les unes et les autres cristallisent différemment. Leur solubilité en présence de sels neutres à concentration croissante n'est pas identique, celle des myoglobines est toujours beaucoup plus grande que celle des hémoglobines correspondant aux concentrations élevées en sels ; enfin les constantes de l'équation de COHN des deux chromoprotéides ne sont jamais identiques. Quant à leur composition chimique elle présente une diversité qui, malgré la spécificité de composition de la myoglobine de chaque animal, apparaît comme extrêmement net. On observe par exemple, que tous les pigments du muscle

sont plus riches en histidine, en lysine et en tryptophane que ceux du sang, lesquels sont par contre nettement plus pauvres en arginine, en tyrosine, en leucine et en valine. Il est donc certain que dans une même espèce les pigments sanguins et musculaires ne sont pas identiques. Comme ils contiennent par ailleurs le même groupement prosthétique (protohème) c'est seulement leur partie protéique, leur globine qui présente des différences de nature. Enfin, la molécule des pigments musculaires doit être considérée comme beaucoup plus simple que celle des pigments sanguins. Le poids moléculaire du premier est en effet de 17.000, celui des seconds de 68.000 ; c'est là un fait sur lequel nous aurons à revenir.

Il ne nous a pas été possible de rechercher l'existence de différences individuelles entre les globines alors que celles-ci se manifestent parfois entre les hémoglobines (ROCHE, DUBOULOZ et JEAN), car le rendement de nos préparations a exigé la mise en œuvre de quantité de muscle provenant de nombreux animaux.

Par ailleurs, et c'est là un fait nouveau, *les myoglobines des trois mammifères étudiés* (Bœuf, Cheval, Chien) *ne sont pas identiques entre elles*, les formes cristallines particulières observées dans les préparations du pigment de Cheval et de Bœuf en sont un premier témoignage ; de même leur différence de solubilité en présence de sels neutres à concentration croissante. A cet égard il convient de remarquer que, si la myoglobine de Cheval est moins soluble que celle de Bœuf et cette dernière que celle du Chien, le pigment musculaire du Chien présente à pH = 6,5 une solubilité dans des milieux salins plus élevée qu'aucune autre protéine connue : à ce pH, il n'est

pas entièrement précipité par le sulfate d'ammonium à saturation.

De plus les constantes de l'équation de COHN présentent des valeurs différentes pour les trois myoglobines étudiées, ce qui traduit leur spécificité. Celle-ci repose sur la diversité de composition des globines. En effet les pigments musculaires de Bœuf, de Cheval et du Chien ont une teneur différente en certains acides aminés, entre autres en histidine, en tyrosine, en alanine et en leucine. Fait curieux, le taux de l'acide aminé présentant les variations les plus grandes dans les diverses hémoglobines, à savoir la cystine, est pratiquement constant dans les myoglobines. *Ces faits permettent de rattacher sans discussion possible la spécificité des myoglobines entre elles, à la composition de leur partie protéique.*

2. Constitution Chimique et Poids moléculaire des myoglobines.

Nos recherches permettent de discuter divers problèmes posés par la structure et le poids moléculaire des myoglobines. Nous avons pu en effet, non seulement déterminer directement le poids moléculaire de ces corps par une méthode physique (osmométrie), mais aussi essayer de calculer celui-ci à partir des données que nous avons établies sur le taux des divers acides aminés présents dans les pigments.

Comme nous l'avons vu, aucun doute n'est possible au sujet du poids moléculaire des hémoglobines, égal à 68.000, valeur correspondant à la présence de quatre atomes de fer — ou quatre molécules d'hématine — par molécule-gramme de pigment. Dans le cas des myoglobines la valeur déterminée par THEORELL

(34.000) doit être abandonnée. Conformément aux résultats de PEDERSEN et aux nôtres le poids moléculaire des myoglobines est égal à 17.000. Ce fait confère à ces protéines un intérêt particulier car leur taille moléculaire apparaît comme égale à une unité de SVEDBERG (Hb) tandis que celle des hémoglobines est égale à quatre (Hb₄). Les pigments musculaires méritent à cet égard d'être rapprochés des erythrocruorines des lamproies (SVEDBERG et ERIKSSON-QUENSSSEL, ROCHE et FONTAINE). Il n'a pas été possible jusqu'ici de polymériser *in vitro*, ni ces erythrocruorines, ni les myoglobines. Par contre les hémoglobines ont pu être dissociées réversiblement en dimères Hb₂ (P.M. = 34.000) sous l'action de l'urée (BURK et GREENBERG, STEINHARDT) ou de la chaleur (ROCHE et CHOUAÏECH).

Afin de relier la détermination physico-chimique du poids moléculaire des myoglobines que nous avons faite et nos résultats à certains éléments de leur structure, nous avons essayé de calculer le poids moléculaire de ces corps à partir de leur composition en acides aminés selon le mode de calcul proposé par BERGMANN et NIEMANN. Ces auteurs ont proposé de calculer le poids moléculaire minimum d'une protéine à partir du rapport stœchiométrique R de tous les acides aminés dans la protéine et de la fréquence F avec laquelle on les rencontre dans celle-ci et de leur poids moléculaire moyen Mm.

Le poids moléculaire moyen Mm est calculé à partir de celui de l'ensemble des acides aminés présents dans la molécule, diminué de 18 (H₂O) en raison de l'union de ceux-ci par liaison peptidique. Le rapport stœchiométrique R est calculé à partir des résultats expérimentaux exprimés en molécules-gramme des

divers acides aminés par 100 grammes de protéine. Enfin la fréquence F de chaque acide aminé est déterminée au moyen de la formule : $\frac{F \times Mm}{M} = \frac{100}{Aa \%}$, dans laquelle $Aa \%$ représente le taux de l'acide aminé étudié, M son poids moléculaire et Mm le poids moléculaire moyen des acides aminés.

$$F = \frac{100}{Aa \%} \times \frac{M}{Mm}.$$

Le produit $F \times R$ constant pour tous les acides aminés étudiés, est égal au nombre total des restes d'acides aminés contenus dans la molécule protéique. Par ailleurs dans tous les cas étudiés par BERGMANN et NIEMANN le nombre total des acides aminés, le nombre des molécules de chacun et la fréquence de celles-ci dans la protéine, sont tous des produits de 2^n par 3^m , n et m étant des nombres entiers positifs dans le premier cas, et des nombres entiers positifs ou égal à zéro dans le second.

A priori, la précision relative du dosage de certains acides aminés dans les protéines va nécessairement de pair avec celle de la détermination de R et, partant, de celle du nombre total des acides aminés, lequel est le plus petit commun multiple des valeurs de F . En fait l'expérience a montré que dans diverses protéines étudiées par BERGMANN et NIEMANN, en particulier dans les hémoglobines, les résultats obtenus présentent une cohérence satisfaisante. Connaissant le nombre total minimum des acides aminés présents et leur poids moléculaire moyen, le poids moléculaire minimum de la protéine peut être facilement calculé. Il est égal au produit du nombre total des acides aminés par le poids moléculaire moyen; sa valeur, établie par ce procédé, est égale à 66.500

pour les hémoglobines de Bœuf, de Cheval, de Chien et de Mouton. La concordance avec les données établies par les méthodes physico-chimiques est donc très satisfaisante, elle est d'autant plus remarquable que les hémoglobines des divers animaux n'ont pas la même composition en acides aminés.

On trouvera dans les tableaux ci-dessous empruntés à BERGMANN et NIEMANN l'ensemble des données à partir desquelles les déterminations ont été faites.

Les résultats obtenus sur les hémoglobines apparaissent comme particulièrement remarquables en raison d'une part, de la diversité de composition de celles-ci et, d'autre part du fait que les quatre unités de SVEDBERG, correspondant chacune à une molécule d'hématine, ne peuvent pas être identiques. En effet aucun des pigments étudiés ne contient de la cystéine en quantité telle qu'une molécule de cet aci-

TABLEAU XVIII.

Teneur en divers acides aminés dans l'hémoglobine après hydrolyse.

Constituant	Hémoglobine			
	Cheval	Mouton	Vache	Chien
Fer	4	4	4	4
Cystéine.....	2	3	3	6
Soufre non cystéique.....	6	12		6
Arginine	12	12	12	12
Histidine	32	32	32	32
Lysine	36	36	36	36

TABLEAU XIX.

Teneur en divers acides aminés de diverses hémoglobines.

Acide aminé	Poids	Poids moléculaire	Mol. gramme p. 100 g. de protéine		Rapport	Fréquence
			trouvé	calculé		
	p. 100					
Lysine.....	8,0	146	0,054	0,054	36	16
Histidine.....	7,4	155	0,047	0,048	32	18
Acide aspartique	6,4	133	0,047	0,048	32	18
Acide glutamique.	3,5	117	0,023	0,024	16	36
Tyrosine.....	3,3	181	0,018	0,018	12	48
Proline.....	2,1	115	0,018	0,018	12	48
Arginine.....	3,1	174	0,018	0,018	12	48
Cystéine.....	0,55	121	0,004	0,004	3	192

de aminé puisse être présente dans une unité de SVEDBERG, puisque l'hémoglobine de Bœuf contient 3 molécules de cystéine, celle de Cheval 2, celle du Chien 6 et celle du Mouton 3.

Nous avons observé par contre que toutes les myoglobines étudiées sont également riches en cystéine, une molécule au moins de cet acide aminé devant être présente par molécule de pigment. Dès lors les myoglobines apparaissent comme de constitution notablement différente de celle des hémoglobines. On trouvera dans le tableau ci-dessous les résultats du calcul des valeurs de R et F faits à partir de nos résultats. La comparaison de ces valeurs et de celles obtenues par BERGMANN et NIEMANN pour les hémoglobines dans les tableaux XVIII et XIX fait nette-

TABEAU XX.

Rapport moléculaire R et fréquence F de divers acides aminés dans les myoglobines pures de Bœuf, de Cheval et de Chien.

Acide aminé	R dans la myoglobine			F dans la myoglobine		
	Bœuf	Cheval	Chien	Bœuf	Cheval	Chien
Cystéine.....	1	1	1	144	144	144
Tyrosine.....	1	2	2	72	72	144
Arginine.....	2	2	2	72	72	72
Tryptophane..	3	3	3	48	48	48
Valine.....	6	6	6	24	24	24
Histidine.....	12	9	12	12	16	12
Lysine.....	12	12	12	12	12	12
Alanine.....	12	12	16	12	12	9
Leucine.....	16	18	16	9	8	9

ment ressortir la diversité des pigments sanguins et musculaires. Par ailleurs, elle illustre à nouveau la spécificité des myoglobines. Dans toutes celles-ci le nombre total des restes d'acides aminés est égal à 144, le poids moléculaire moyen de ces corps étant de 117,6. Aussi le poids moléculaire moyen des myoglobines déterminé par voie chimique est-il de : $144 \times 117,6 = 16.934$. Il existe donc une remarquable concordance entre les résultats des déterminations faites par voie chimique et par osmométrie. C'est là une nouvelle justification du mode de calcul proposé par BERGMANN et NIEMANN.

CONCLUSIONS.

1. Nous avons mis au point une méthode de préparation des hémoglobines musculaires pures, basée sur le fractionnement des extraits de muscle cardiaque ou squelettique de divers mammifères au moyen du sulfate d'ammonium à $\text{pH} = 6,8$. Le test de pureté des produits obtenus est leur obéissance à la relation de COHN, à savoir la variation linéaire du logarithme de leur solubilité en fonction de la force ionique du milieu.

2. Nous avons étudié la cristallisation, la solubilité en présence de sulfate d'ammonium à concentration croissante, à $\text{pH} = 6,8$ et à 21° , la composition en acides aminés et le poids moléculaire des myoglobines pures de Bœuf, de Cheval et de Chien. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux apportés par l'étude antérieure des hémoglobines dans le même domaine.

3. La myoglobine d'une espèce animale se distingue de l'hémoglobine de la même espèce par un ensemble de caractères. D'une forme cristalline différente elle est toujours beaucoup plus soluble en présence de sels neutres ; ceux-ci ne la précipitent qu'à une concentration plus élevée que l'hémoglobine avec laquelle on la rencontre dans un organisme. Sa composition en acides aminés traduit toujours une plus grande richesse en tryptophane, en histidine et en

lysine, mais par contre une pauvreté relative en arginine, en tyrosine, en leucine et en valine. Enfin, le poids moléculaire des deux pigments est différent ; égal à 17.000 pour la myoglobine (Hb) il est de 68.000 pour l'hémoglobine (Hb₄).

4. Les diverses myoglobines ne sont pas identiques ; il existe une spécificité dans la série de ces pigments comme dans celle des hémoglobines. Les deux myoglobines obtenues à l'état cristallisé (Bœuf et Cheval) présentent un aspect cristallin différent, la seconde cristallisant beaucoup plus facilement que la première et le pigment du Chien se montrant réfractaire à la cristallisation. La solubilité de ces trois corps diffère, tant en ce qui concerne les limites de force ionique entre lesquelles s'opère leur précipitation ou la dissolution de leurs cristaux que la valeur des constantes K' et β' de l'équation de COHN appliquées à leur solubilité dans des milieux de concentration croissante en sulfate d'ammonium à pH = 6,8 et à 21°. Enfin si leur teneur en cystéine est identique contrairement à ce qu'il y a lieu pour les diverses hémoglobines, on note des différences importantes de leur teneur en d'autres acides aminés, en particulier de leur teneur en alanine, en histidine, en leucine et en tyrosine. Leur spécificité repose donc sur la diversité de composition, et sans doute aussi de structure de leur partie protéique.

5. La détermination par osmométrie (méthode d'ADAIR) du poids moléculaire des myoglobines pures permet de considérer celles-ci comme ayant un pH = 17.000 (unité de SVEDBERG). L'application de la méthode chimique de la détermination du poids moléculaire, due à BERGMANN et NIEMANN, aux résultats de

nos dosages d'acides aminés dans les myoglobines a donné une valeur très voisine soit $PM = 16.934$, le nombre total des restes d'acides aminés par molécule de pigment étant 144 comme par ailleurs une pareille concordance de résultats a déjà été obtenue dans le cas des hémoglobines, la méthode chimique de BERGMANN et NIEMANN apparaît comme satisfaisante.

Marseille, le 3 février 1942.

Vu le Président,
JEAN ROCHE.

Vu et approuvé,

Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

Vu et permis d'imprimer.

Aix, le 13 février 1942.

Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ADAIR (G. S.). — A critical study of the direct method of measuring the osmotic pressure of haemoglobin. *Proc. Roy. Soc. A*, 1925, **108**, 627-637 et **120**, 1928, 573.
2. ANSON (M. L.), BARCROFT (J.), MIRSKY (A. E.) et OÏNUMA (S.). — On the correlation between the spectra of various haemoglobins and their relative affinities for oxygen and carbon monoxid. *Proc. Roy. Soc. B.*, 1924, **97**, 61-83.
3. ANSON (M. L.) et MIRSKY (A. E.). — Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and hemo. *Journ. Gen. Physiol.*, 1930, **13**, 469-476.
4. BEACH (E. F.), BERNSTEIN (S. S.) HUMMEL (F. G.), WILLIAMS (H. H.), et MACY (I. G.). — Total sulfur, cystine and methionine content of blood globine of five mammalian species. *Journ. of biol. Chem.*, 1939, **130**, 115-119.
5. BÉNÉVENT (M. Th.). — Contribution à l'étude biochimique des cytochromes et des hématies cellulaires. 1 vol. 130 p. *Declume édit.*, 1936.
6. BERGMANN (C.) and NIEMANN (C.). — On the structure of proteins catte haemoglobin, egg albumin, cattle fibrine and gelatin. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **118**, 301-314.
7. BERTIN-SANS (H.) et MOITESSIER (J.). — Nouveau procédé pour obtenir de l'oxyhémoglobine à l'aide d'oxyhématine et d'une matière albuminoïde. *Bull. Soc. Chim.*, 1893, **9**, 243-244.
8. BLOCK (R. J.). — The determination of the amino acids. *Burges Publishing Company*, 1938, 1 vol., 91 p.
9. BUTLER (M.) et MONTGOMERY (H.). — The solubility of the plasma proteins. Dependence on salt and plasma concentration in concentrated solutions of potassium sulfate. *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **99**, 173-195.
10. CAMUS (J.) et PAGNIEZ. — Hémoglobinurie d'origine musculaire. *C. R. Acad. Sc.*, 1902 ; cité d'après (CAMUS (J.). Les Hémoglobinuries (étude pathogénique), 1904, *Thèse Méd.*, Paris 1904, 1 vol., 126 p. *C. Naud. édit.*
11. COHN (E. J.). — The physical Chemistry of the proteins. *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349-437.
12. DESNUELLE (P.). — Sur le dosage colorimétrique de l'alanine et de la somme : serine + acide aspartique dans les protéines. Application à la protéine du ferment jaune. *Enzymolog.*, 1838, **5**, 37-44.

13. DUMAZERT (C.) et POGGI (R.). — Sur le microdosage colorimétrique de l'arginine et de divers dérivés guanidiques monosubstitués. Application aux hydrolysats protéiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 1381-1387.
14. FOLIN (O.) et MARENZI (A. D.). — An improved colorimetric method for the determination of cystine in protein. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **93**, 103-108.
- 14 bis. FOLIN (O.) et MARENZI (A. D.). — Cités d'après [8].
15. FROMAGEOT (C.) et MOURGUE (M.). — Dosage de la valine et de la leucine dans les matières protéiques. *Enzymology*, 1941, **9**, 329-336.
16. HANKE (M. T.) et KOESLER (K. H.). — The quantitative colorimetric estimation of histidine in protein and protein containing matter. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **51**, 421-483.
17. HILL (R.). — Haemoglobin in perspective in Biochemistry. pp. 127-136. 1 vol. *Cambridge University press*, 362 p.
18. KOMM (E.) et BOHRINGER (E.). — Ein Beitrag zur Tryptophanaldehydreaktion. *Zt. f. physiol. Chem.*, 1923, **124**, 287-294.
19. KOSSEL (A.). — The protamines and histones. 1 vol. in *Coll. Monographs on chemistry*, Longmans, Green and Co. Ltd., 1928, London, 107 p.
20. MILLIKAN (G. A.). — The Kinetics of muscle haemoglobin. *Proc. Roy. Soc.*, **120**, Série B, 366-383, 1936.
21. MILLIKAN (G. A.). — Muscle haemoglobin. *Physiol. Rev.*, 1939, **19**, 503-523.
22. MORGAN (V. E.). — Studies on myoglobin. I. The solubility of myoglobin in concentrated ammonium sulfate solutions. *Journ. of biol. Chem.*, 1936, **112**, 557.
23. MOUTTE (M.). — Solubilité en présence de sels neutres et spécificité des hémoglobines sanguines. 1 vol., *Declume édit.*, 80 p., 1941.
24. ROCHE (J.). — Essai sur la biochimie générale et comparée des pigments respiratoires. 1 vol., *Masson et Cie édit.*, Paris 1935.
25. ROCHE (J.). — Recherches sur la globine. *C. R. Lab. Cartenberg*, 1930, **18**, Fasc. 4, 34.
26. ROCHE (J.). — Sur la combinaison de l'hématine à la globine. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1971.
27. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et CHOUAIECH (M. S.). — Sur les protéines sanguines de quelques vertébrés marins. Protéines sériques et pigments hémoglobiniques. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1301.
28. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MOUTTE (M.). — Solubilité dans les solutions salines concentrées et caractères spécifiques des hémoglobines sanguines. I. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 114, 11299.
29. ROCHE (A.), DORIER (M.) et SAMUEL (L.). — La précipitation des protéines du sérum par le sulfate d'ammonium. L'homme normal. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1019.

30. ROCHE (J.), DUBOULOZ (P.) et JEAN (G.). — Recherches sur les globines. III. Sur la spécificité du constituant protéique des hémoglobines. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 768.
 31. ROCHE (A.) et MARQUET (F.). — Microdosage de l'azote protéique en présence de sels ammoniacaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 1630-1632.
 32. ROCHE (J.) et MOURGUE (M.). — Recherches sur les globines. IV. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1329-1338.
 33. ROCHE (J.) et VIEIL (H.). — Préparation et poids moléculaire de la myoglobine de Cheval (hémoglobine musculaire) cristallisée. *C. R. Acad. Sc.*, 1940, 314-316.
 34. ROSSI (A.). — Sulla costituzione Chimica della mioglobina. *Arch. Sc. Biol.*, 1940, **26**, 244-264.
 35. ROSSI (A.) et TRAVIA (L.). — Recherche sulla mioglobina. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 15, **4**, 1940, **8**.
 36. SVEDBERG (T.). — A discussion on the protein molecule. *Roy. Soc. of London. Series B*, **846**, 127 pp. 1-56, 1939.
 37. THEORELL (A. H. T.). — Kristallinisches Myoglobin. I. Kristallisieren und Reinigung des Myoglobins sowie vorläufige Mitteilung über sein Molekulargewicht. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **252**, 1-7.
 38. THEORELL (A. H. T.). — Kristallinisches Myoglobin II. Sedimentations Konstante und Molekulargewicht der Myoglobins. *Bioch. Ztschr.*, 1934, **267**, 45-54.
 39. THEORELL (A. H. T.). — Kristallinisches Myoglobin III. Die absolute lichtabsorption von oxy, carboxy, meta and reduzierten Myoglobin. *Biochem. Ztsch.*, 1934, **268**, 55-63.
 40. THEORELL (A. H. T.). — Kristallinisches Myoglobin IV. Myoglobin gleichgewicht mit Sauerstoff und Kohlenoxyd. *Biochem. Ztschr.*, 1934, **268**, 64-72.
 41. THEORELL (A. H. T.). — Kristallinisches Myoglobin V. Die Sauerstoffbindungskurve des Myoglobins. *Biochem. Ztschr.*, 1934, **268**, 72-82.
 42. VICKERY (H. B.) et WHITE (A.). — The use of cystéine cuprous mercaptide in the determination of cystine. *Journ. of biol. Chem.*, 1933, **99**, 701-715.
 43. WHIPPLE (F. H.) et ROBSCHT-ROBBINS (G. S.). — Cités d'après [21].
-

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
Introduction	9
I. Hémoglobines sanguines et hémoglobines musculaires ; hémoglobines et myoglobines....	9
II. Etat actuel de nos connaissances sur les myoglobines	11
A. Répartition des myoglobines.....	12
B. Préparation des myoglobines pures.	15
C. Propriétés chimiques et physico-chimiques des myoglobines.....	17
D. Rôle de la myoglobine dans l'organisme	22
III. Objet du travail	26
Recherches personnelles	27
A. Partie expérimentale	28
I. Préparation des myoglobines	28
II. Solubilité des myoglobines dans les solutions salines concentrées	38
III. Composition en acides aminés des myoglobines	56
IV. Poids moléculaire (osmométrie).....	61
B. Discussion des résultats	63
1. Caractères généraux et spécificité des myoglobines	63
2. Constitution et poids moléculaire des myoglobines	65
Conclusions	71
Bibliographie	74

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

